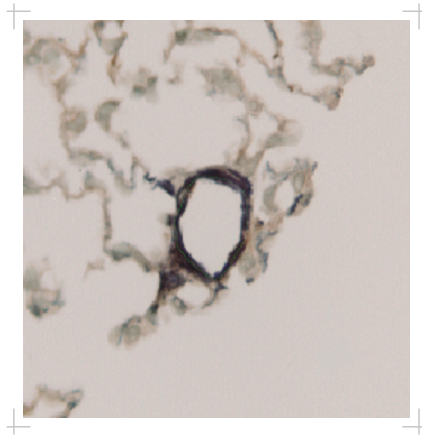


JAN SASCHA HACKEMACK

---

Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung  
der experimentellen chronischen pulmonalen Hypertonie  
der Maus unter besonderer Berücksichtigung der  
Histologie und der Hämodynamik



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem  
Institut für Veterinär-Pathologie des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Eberhard Burkhardt

und

dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,  
Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums Gießen

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann

**Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung der experimentellen  
chronischen pulmonalen Hypertonie der Maus unter besonderer  
Berücksichtigung der Histologie und der Hämodynamik**

INAUGURALDISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Jan Sascha Hackemack**

Tierarzt aus Ulm

Gießen 2018

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Eberhard Burkhardt  
Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 29.03.2018



*Für meine Familie*

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Jan Sascha Hackemack

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Vorwort .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
3.1	Physiologie der pulmonalen Strombahn.....	8
3.2	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion.....	9
3.2.1	Pathophysiologie der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV).....	10
3.3	Pulmonale Hypertonie (PH) .....	11
3.3.1	Pathomechanismen der Entstehung der PH.....	14
3.4	NO-cGMP-Signaltransduktionsweg.....	15
3.4.1	Stickstoffmonoxid (NO).....	15
3.4.2	Der second messenger cGMP.....	17
3.5	Die Guanylatzyklen.....	17
3.5.1	Die membranständige Guanylatzyklase .....	18
3.5.2	Die lösliche Guanylatzyklase .....	20
3.6	Oxidativer Stress .....	23
3.7	NO-unabhängige Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase.....	23
3.8	HMR 1766 .....	26
3.9	Experimentelles Tiermodell für die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie in Mäusen .....	27
3.10	Zielsetzung der Arbeit .....	28
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
4.1	Material.....	29
4.1.1	Versuchstiere .....	29
4.1.2	Pharmaka und Substanzen.....	29
4.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	30
4.1.4	Geräte und Material für die Tierexperimente.....	31
4.1.5	Geräte und Material für die histologische Auswertung.....	32
4.1.6	Antikörper.....	33
4.1.7	Geräte und Software für die Gefäßmorphometrie .....	34
4.1.8	Geräte und Material für das Radiotelemetriesystem .....	34
4.2	Methoden.....	34
4.2.1	Versuchstiergruppen.....	34

4.2.2	Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie der Maus .....	36
4.2.3	Medikamentenapplikation .....	37
4.2.4	Rechtsventrikuläre hämodynamische Messungen.....	38
4.2.5	Messung des Hämatokritwertes.....	38
4.2.6	Probenentnahme der Lunge.....	39
4.2.7	Probenentnahme und Präparation des Herzens .....	40
4.2.8	Vorbereitung des Gewebes auf histologische und immunhistochemische Analysen .....	40
4.2.9	Immunhistochemische Doppelfärbung gegen alpha smooth muscle actin und gegen von-Willebrand-Faktor VIII.....	41
4.2.10	Durchführung der morphometrischen Auswertung der Lungengefäße (Morphometrie der Lungengefäße) .....	42
4.2.11	Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge .....	44
4.2.12	Telemetrie.....	47
4.2.13	Statistische Datenauswertung.....	52
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
5.1	Hämatokrit.....	53
5.2	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion.....	54
5.3	Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck.....	57
5.4	Herzgewichtsverhältnisse (Heart Ratio).....	59
5.5	Muskularisierungsgrad der Lungengefäße .....	61
5.6	Telemetrie.....	65
5.7	cGMP-Konzentration .....	68
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
6.1	Das Tiermodell .....	69
6.2	Die Regulation der sGC-Aktivität .....	72
6.3	HMR 1766 und seine Auswirkungen auf das Krankheitsbild der pulmonalarteriellen Hypertonie.....	78
6.4	Klinische Relevanz.....	84
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
7.1	Zusammenfassung .....	89
7.2	Summary.....	91
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>111</b>

<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>112</b>
-----------	------------------------	------------

## 1 Abkürzungsverzeichnis

1 N NaOH	1 normale Natronlauge
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
A.	lat. Arteria (Arterie)
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ANP	Atriales atriuretisches Peptid
ARDS	Atemnotsyndrom des Erwachsenen (Adult Respiratory Distress Syndrom)
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	b-type natriuretisches Peptid (brain natriuretic peptide)
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic Adenosinemonophosphate)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic Guanosinemonophosphate)
cm	Zentimeter
CNP	c-type natriuretisches Peptid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
CTEPH	chronisch-thrombolischer pulmonaler
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDRF	Endothelin Derived Relaxing Factor
EMA	European Medicines Agency, Europäische Arzneimittel- Agentur
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Fa.	Firma
g	Gramm
GC	Guanylatzyklase
GTP	Guanosintriphosphat

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HR	Herzfrequenz (heart rate)
HTS	High-Throughput-Screening
i.p.	intraperitoneal
ILD	interstitial lung disease
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Leber-CI	Leberzirrhose
LV	linker Ventrikel
M	Molar
MCT	Monocrotalin
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonalerarterieller Druck
MW	Mittelwert
n	Anzahl (number)
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ODQ	1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1
PAH	pulmonalerarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalerarterieller Druck (pulmonary arterial pressure)
PASMC	pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen
PBS	Phosphatpuffer (Lösung)
PC	Personalcomputer
PCH	pulmonalkapillare Hämangiomatose
PDE	Phosphodiesterase

pGC	partikuläre Guanylatzyklase (membranständige Guanylatzyklase)
PH	pulmonale Hypertonie
PVOD	pulmonale venookklusive Erkrankung
PVH	pulmonal-venöse Hypertonie
ROS	reaktive Sauerstoffverbindung (reactive oxygen species)
RV	rechter Ventrikel
RV/LV+S	Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel + Septum
RVP	rechtsventrikulärer Blutdruck (right ventricular pressure)
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck (right ventricular systolic pressure)
s.	siehe
s.c.	subkutan
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SAP	systemisch arterieller Druck (systemic arterial pressure)
sGC	lösliche Guanylatzyklase (soluable guanylatcyclase)
SEM	standard error mean (Standardfehler)
sma	smooth muscle actin (glattmuskuläres Aktin)
SMC	glatte Muskelzelle (smooth muscle cell)
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TOS	toxic oil syndrome (Spanien 1982)
u.a.	unter anderem
V.	lat. vena (Vene)
VSMC	vascular smooth muscle cell
vWF	von Willebrand Faktor (Faktor VIII)
wt	Wild type
WHO	World Health Organisation
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol
z. B.	zum Beispiel



## **2 Vorwort**

Die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von November 2003 bis August 2009 im Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, Justus-Liebig-Universität Gießen, Laborbereich von Prof. Dr. med. W. Seeger in Herrn Prof. Dr. rer. nat. Weißmanns Arbeitsgruppe angefertigt. Betreut wurde die Dissertation durch Herrn Prof. Dr. med. vet. Eberhard Burkhardt und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann. Die vorliegende Dissertation befasst sich mit dem Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie (PH), einer Erhöhung des Blutdruckes in der Pulmonalarterie. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und reichen von kongenitalen über idiopathische zu erworbenen Ursachen. Die vorliegende Arbeit befasst sich im Speziellen mit der PH, induziert durch Hypoxie.

Untersucht wird hier die Auswirkung der Aktivierung der sGC auf diese Form der PH. Dabei kam die Substanz HMR 1766 zum Einsatz, ein sGC-Aktivator. Gegenstand der Untersuchung war, ob der sGC-Aktivator HMR 1766 einen positiven Effekt auf das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie zeigte, und inwieweit es einem voranschreitenden Krankheitsverlauf entgegenwirken konnte.

Zur Auswertung wurde die Protokollierung des telemetrisch gemessenen rechtsventrikulären Blutdruckes von lebenden, wachen Mäusen herangezogen sowie die Lungengefäße histomorphometrisch und die präparierten Herzen nach dem Tod der Mäuse analysiert.

### **3 Einleitung**

#### **3.1 Physiologie der pulmonalen Strombahn**

Im Lungenkreislauf strömt das sauerstoffarme Blut aus der rechten Vorkammer über den rechten Ventrikel des Herzens in die Arteria pulmonalis, die sich bis zu den Lungenkapillaren aufzweigt. Die Kapillaren bilden in den Alveolarwänden ein dichtes Netz und gewährleisten so einen breitflächigen Blutstrom, der die Alveolarwände überzieht. Das mit Sauerstoff gesättigte Blut fließt über die linke Vorkammer in den linken Ventrikel und wird in den Körperkreislauf gepumpt (Nickel, Schummer und Seiferle, 1996).

Verglichen mit dem Körperkreislauf weist das Lungengefäßsystem einen erheblich geringeren Druck auf. Dieses besteht aus einer enormen Anzahl von Gefäßaufzweigungen und sichert so eine große Fläche des Gefäßbettes. Außerdem besitzen die Pulmonalgefäße nur einen geringen Anteil an glatter Muskulatur. Sie sind im Vergleich zu Arteriolen des Körperkreislaufes geringer muskularisiert. Sie besitzen eine große elastische Dehnbarkeit und es tritt aufgrund der wenig ausgeprägten Muskulatur und der Balance von Vasodilatoren und -konstriktoren ein geringerer Tonus auf. Im Lungengefäßsystem herrscht ein Strömungswiderstand, der ca. nur ein Zehntel des Widerstandes des Körperkreislaufes beträgt. Entsprechend weist der Lungenkreislauf geringere Drücke auf als der Körperkreislauf. In der Arteria pulmonalis beträgt der systolische Druck eines gesunden Menschen ca. 20-25 mmHg, der diastolische Druck 9-12 mmHg und der mittlere pulmonale Druck ca. 14 mmHg (Schmidt und Thews, 1997).

Die hydrostatischen Drücke in den Kapillaren sind gering, um Flüssigkeitsverluste aus den Kapillaren in das Interstitium oder in die Alveolen zu verhindern.

Die Lungenperfusion wird nicht nur von intravasalen Druckgradienten bestimmt, sondern auch von extravasalen Drücken, wie alveolärer Luftdruck, interstitieller hydrostatischer Druck und elastischer Retraktionskraft. Außerdem haben Schwerkraft und Körperhaltung Einfluss auf die Perfusion (Faller, 1995).

### **3.2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion**

Dass es zu einem pulmonalarteriellen Druckanstieg unter hypoxischer Ventilation kommt, wurde erstmalig von Bradford und Dean beschrieben (Bradford und Dean, 1894). In weiteren Experimenten von Euler und Liljestrand im Jahr 1946 wurde dann der physiologische Sinn der, diesem Druckanstieg zugrunde liegenden, sogenannten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) beschrieben. Der Mechanismus der HPV wurde daher auch als Euler-Liljestrand-Mechanismus bekannt (von Euler und Liljestrand, 1946). Die Existenz der HPV wurde bei fast allen darauf untersuchten Säugetieren nachgewiesen (Cutaia und Rounds, 1997). Einige Hochtaltiere wie z.B. Yaks oder Lamas zeigen eine stark verminderte detektierbare HPV. Diese Säugetiere haben sich an große Höhen angepasst (Durmowicz et al., 1993).

Die HPV stellt in der gesunden Lunge einen physiologischen Regulationsprozess dar und wirkt bei alveolärer Hypoventilation kompensatorisch (Reinhold und Höchel, 2005). Diese physiologische Regulation ist neben den anatomischen Gegebenheiten notwendig, um in der Lunge einen effizienten Gasaustausch zu gewährleisten. In unzureichend und nicht ventilierten Lungenarealen sinkt der Sauerstoffpartialdruck. Diese Lungenabschnitte tragen wenig oder gar nicht zur Oxygenierung des Blutes bei. Dadurch verlässt das Blut aus diesen minderbelüfteten Abschnitten die Lunge mit unzureichender Sauerstoffbeladung. Der Blutfluss muss in gut belüftete Lungenareale umgeleitet werden. Zur Aufrechterhaltung des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes muss in solchen minderbelüfteten Lungenarealen die Perfusion an die Ventilationsbedingungen angepasst werden (Bartels et al., 1973; Voelkel, 1986). Dies geschieht durch Reduktion des Blutflusses in diesen Lungenregionen. Die Reduktion des Blutflusses wird durch eine präkapilläre Vasokonstriktion, der HPV, ausgelöst, welche zu einer vaskulären Widerstandserhöhung in den präkapillären muskularisierten Arteriolen führt. Somit wird der Blutfluss durch die HPV aus hypoventilierten Lungenbezirken ferngehalten und in gut ventilierte Regionen umgeleitet (Reinhold und Höchel, 2005; Weißmann, 2002).

Schon bei einem alveolären Sauerstoffpartialdruck von 80mmHg wird der Mechanismus der HPV ausgelöst. Die Intensität der HPV hängt von der Stärke und Dauer der alveolären Hypoxie ab (Weissmann et al., 1995).

Man teilt die HPV je nach Dauer der Hypoxie in 3 Phasen ein: 1. die akute alveoläre Hypoxie (Sekunden bis Minuten), 2. die protrahierte alveoläre Hypoxie (Stunden) und 3.

die chronische Hypoxie, die neben der HPV einen Gefäßumbau in den Pulmonalgefäßen bewirkt (Weissmann et al., 2001).

Der Euler-Liljestrand-Mechanismus behandelt grundlegende Kenntnisse über die pulmonale Zirkulation (Chrysta und West, 1991; Fishman, 1998). Dennoch sind viele Einzelheiten des Regulationsmechanismus der HPV ungeklärt. Um ein umfassendes Verständnis dieser Regulationsprinzipien der HPV zu erlangen, spielen die Faktoren, welche für eine Kontraktion der glatten Muskulatur der präkapillären Gefäße unter Hypoxie verantwortlich sind, eine entscheidende Rolle. Wichtig sind die Zellen, die als Sauerstoffsensoren fungieren sowie die zelluläre Struktur dieser Sensoren, und der Mechanismus der inter- und intrazellulären Signaltransduktion (Hillier et al., 1997; Staub, 1985). Eine Störung im Sinne eines Ausbleibens dieses Mechanismus kann zu schweren klinischen Problemen führen.

### **3.2.1 Pathophysiologie der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV)**

Ist der Mechanismus der HPV gestört, kann das schwerwiegende Folgen haben. Auf der einen Seite ist eine Störung des Euler-Liljestrand-Mechanismus zu nennen, wie sie bei Pneumonien, dem Atemnotsyndrom (ARDS) oder bei portaler Hypertension, ausgelöst durch eine Leberzirrhose, vorkommt (Voelkel, 1986; Jolin und Bjertnaes, 1991). Es tritt eine unzureichende Blutoxygenierung ein, die eine arterielle Hypoxämie zur Folge hat.

Auf der anderen Seite wirkt sich eine generalisierte alveoläre Hypoxie pathophysiologisch auf die Lunge aus. Generalisiert bedeutet, dass in allen Lungenbereichen eine hypoxische Vasokonstriktion auftritt. Dies tritt bei Erkrankungen auf, die eine alveoläre Hypoventilation zur Folge haben, zum Beispiel bei chronisch obstruktiven und restriktiven Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale und der chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD, chronic obstructive pulmonary disease). Aufgrund der ständigen Vasokonstriktionen kommt es zu Verkleinerungen des Gefäßdurchmessers und damit zum Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes. Der pulmonalarterielle Druck steigt und der rechte Ventrikel des Herzens kann überbelastet werden (Olschewski et al., 1999).

Die pulmonalen Blutgefäße weisen dabei eine Media- und Adventitiahypertrophie und eine so genannte „de novo“ Muskularisation auf (Emergy, 1994). Die Intima hingegen zeigt unter Hypoxie kaum Veränderungen (Meyrick und Reid, 1980). Der rechte Ventrikel

hypertrophiert ebenfalls und es entwickelt sich daraus das Cor pulmonale (Hampl und Herget, 2000; Riede und Schäfer, 1993).

### **3.3 Pulmonale Hypertonie (PH)**

Unter einer pulmonalen Hypertonie sind Erkrankungen zusammengefasst, die durch eine Erhöhung des Blutdruckes im pulmonalen Kreislauf definiert sind. Der Blutdruck in den Lungenarterien steigt in Ruhe auf mehr als 25 mmHg und unter Belastung auf über 30 mmHg (Galie et al., 2004). Bei gesunden Personen wird in Ruhe ein pulmonalarterieller Blutdruck von 20 mmHg und bei Belastung von 30 mmHg selten überschritten (Gutner et al., 1975). Je nach Höhe des pulmonalarteriellen Blutdruckes unterscheidet man zwischen verschiedenen Schweregraden. Bei mittleren pulmonalarteriellen Drücken von 25-45 mmHg spricht man von einer milden PH; bei mehr als 45 mmHG von einer schweren PH. Im Jahr 1973 erfolgte eine Einteilung nach histo-pathologischen Kriterien in plexogene pulmonale Artheriopathie (primäre pulmonale Hypertonie), chronisch tromboembolische pulmonale Hypertonie und venookklusive Lungenerkrankungen (Hatano, 1975). Die heute gültige Klassifikation wurde auf dem 5. WHO-Weltsymposium zur Pulmonalen Hypertonie in Nizza 2013 beschlossen. Die pulmonale Hypertonie wird entsprechend in fünf Kategorien eingeteilt, wie sie in Tabelle 1 auf der Seite 12 beschrieben sind. Im Jahr 2008 wurden die letzten Definitionen in Dana Point (USA) beschlossen, welche 2013 in Nizza überarbeitet wurden. Aufgrund neuer Erkenntnisse wurde die Einteilung innerhalb der Gruppen geringfügig verändert. Neue Gendefekte wurden bei der hereditären pulmonalarteriellen Hypertonie aufgenommen und die 2. Kategorie wurde um angeborene oder erworbene Einfluss- bzw. Ausflusstraktobstruktionen des linken Herzens sowie angeborene Kardiomyopathien erweitert.

**Tab. 1: Nizza-Klassifikation der pulmonalen Hypertonie 2013**

**Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)**

- Idiopathische PAH
- Hereditäre PAH
  - BMPR2 (Gendefekt)
  - ALK-1, ENG, Smad9, CAV1, KCNK3 (Gendefekte)
  - Unbekannt
- Medikamenten- und toxininduziert
- Assoziiert mit
  - Bindegewbserkrankung
  - HIV-Infektion
  - Portaler Hypertension
  - Angeborenem Herzfehler
  - Schistosomiasis
- Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose (PCH)
- Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)

**Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankung**

- Linksventrikuläre systolische Dysfunktion
- Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion
- Klappenerkrankung
- Kongenitale/erworbene Ein-/Ausflusstraktobstruktion des linken Herzens und kongenitale Kardiomyopathien

**Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie**

- Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD)
- Interstitielle Lungenerkrankungen
- Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktivem/obstruktivem Muster
- Schlafbezogene Atemstörungen
- Alveoläre Hypoventilationssyndrome
- Chronische Höhenexposition
- Pulmonale Fehlentwicklungen

**Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie**

**Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen**

- Hämatologische Erkrankungen: chronisch-hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
- Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose, Lymphangioliomatose
- Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheiten, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
- Andere: tumoröse Obstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz, segmentale PH

(Tab. 1: aus Rosenkranz, 2014)

Neben dieser diagnostischen Einteilung werden die Patienten in der angepassten Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) zur Therapieplanung in vier verschiedene Schweregrade eingeteilt. Außerdem kann anhand dieser Klassifikation eine Aussage über die Prognose gestellt werden. Aufgrund der initial milden Symptome wird eine pulmonale Hypertonie bei den meisten erkrankten Patienten erst in der Klasse III und IV der NYHA-Klassifikation diagnostiziert (siehe Tabelle 2).

**Tab. 2: Angepasste NYHA - Klassifikation bei pulmonaler Hypertonie**

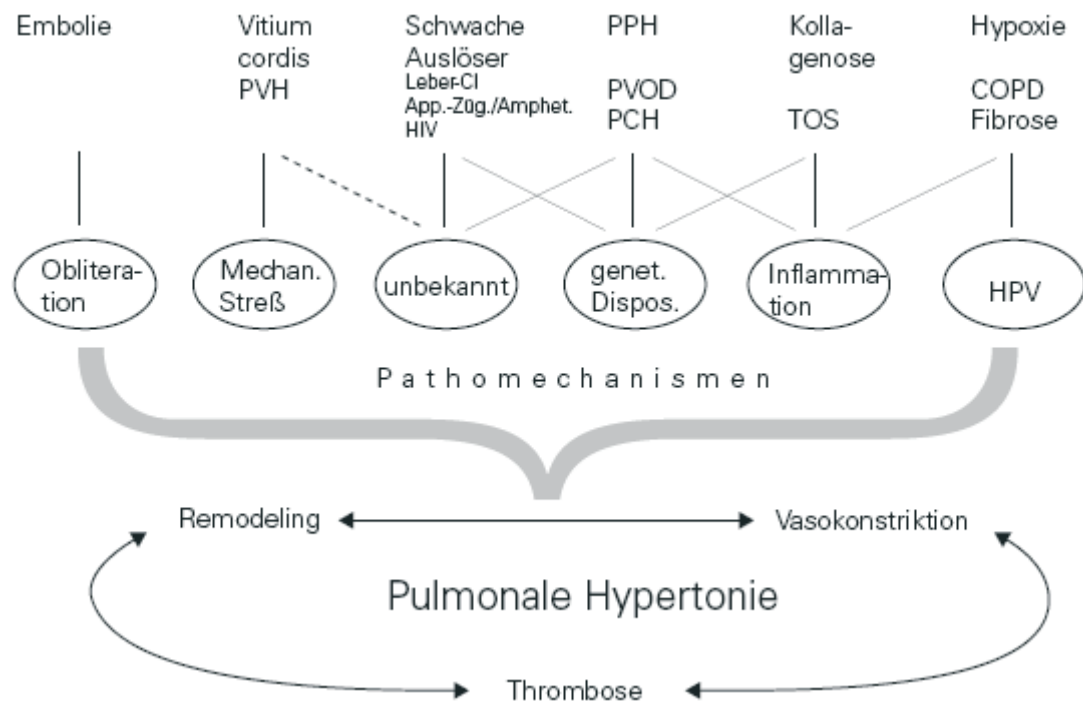
Klasse I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität.</li> <li>• Normale körperliche Belastungen führen nicht zu vermehrten Dyspnoe (= <i>Atemnot</i>) oder Müdigkeit, thorakalen (= <i>in der Brust</i>) Schmerzen oder Schwächeanfällen.</li> </ul>
Klasse II	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit einer leichten Einschränkung der körperlichen Aktivität.</li> <li>• Keine Beschwerden in Ruhe.</li> <li>• Normale körperliche Aktivität führt zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.</li> </ul>
Klasse III	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität.</li> <li>• Keine Beschwerden in Ruhe.</li> <li>• Bereits leichtere als normale Belastungen führen zu Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.</li> </ul>
Klasse IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit Unfähigkeit, irgendwelche körperlichen Belastungen ohne Beschwerden auszuführen.</li> <li>• Zeichen der manifesten Rechtsherzinsuffizienz.</li> <li>• Dyspnoe und/oder Müdigkeit können in Ruhe vorhanden sein.</li> <li>• Bei geringster Aktivität werden die Beschwerden verstärkt.</li> </ul>

(Tab. 2: aus Olschewski et al., 2002)

### **3.3.1 Pathomechanismen der Entstehung der PH**

Die PH ist eine bedeutende kardiovaskuläre Erkrankung. Sie kann sich aus verschiedenen Pathomechanismen entwickeln (siehe Abbildung 1). Hierbei zu nennen sind Inflammation, mechanischer Stress, hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV), primäre Obliteration sowie eine genetische Prädisposition. Ebenfalls können chronische Virusinfektionen, portale Hypertonie, der Missbrauch von Appetitzüglern und Amphetamine eine PH verursachen. Halten diese Pathomechanismen lange oder dauerhaft an, führt dies neben einer chronischen Vasokonstriktion zu einem strukturellen Gefäßumbau der Pulmonalgefäße mit Lumenverengung durch Remodeling. Schließlich entsteht durch die chronische Belastung eine PH. Der Lungenhochdruck führt zusätzlich zu einer Rechtsherzhypertrophie. Die Adaption des rechten Herzens besteht so lange, bis die Kompensationsleistung des Herzens voll ausgeschöpft ist. Schließlich kommt es zu einem Rechtsherzversagen, das letztlich zum Cor pulmonale mit Rechtsherzdekompensation führt (Olschewski, 2000).





**Abb. 1:** Pathomechanismen der Entstehung der pulmonalen Hypertonie (aus: Olschewski, 2000), Abkürzungen stehen für: pulmonal-venöse Hypertonie (PVH), Leberzirrhose (Leber-CI), humanes Immundefizienzvirus (HIV), pulmonale Hypertonie (PPH), pulmonale venookklusive Erkrankung/disease (PVOD), pulmonalkapillare Hämangiomatose (PCH), toxic oil syndrome (TOS), chronisch obstruktive Lungenerkrankung/chronic obstructive pulmonary disease (COPD), hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

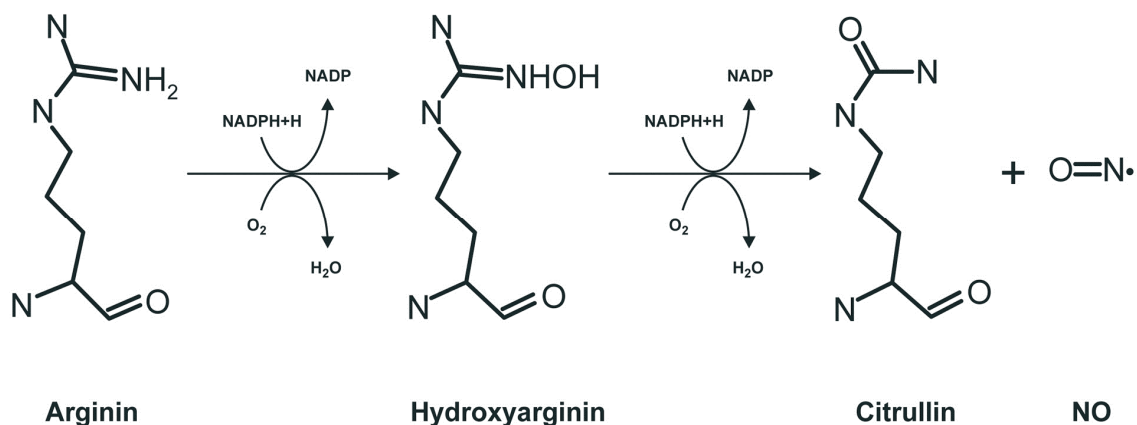
### 3.4 NO-cGMP-Signaltransduktionsweg

#### 3.4.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Seit langem ist die gefäßrelaxierende Wirkung bestimmter physiologischer Botenstoffe und anderer chemischer Substanzen bekannt. Acetylcholin und Bradykinin binden an Rezeptoren der Gefäßwand und führen zur Senkung des vaskulären Tonus. Ebenfalls verringern organische Nitrats wie z. B. Nitroglycerin den Gefäßtonus. Wie genau die Botenstoffe oder die chemischen Substanzen wirken, war allerdings lange ungeklärt. 1980 zeigten Furchgott und Zawadzki, dass eine durch Acetylcholin vermittelte Relaxation der Blutgefäße endothelabhängig war (Furchgott und Zawadzki, 1980).

Die Vermutung war, dass Acetylcholin an Rezeptoren der Endothelzellen bindet und dadurch die Sezernierung eines weiteren Botenstoffes vermittelt. Zunächst bezeichnete man diese noch unbekannte Struktur als endothelial derived relaxing factor (EDRF) (Furchgott und Zawadzki, 1980; Moncada S. et al., 1991).

Erst 1987 identifizierten Palmer, Ignarro et al. EDRF als das gasförmige Radikal Stickstoffmonoxid (NO) (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987). Desweiteren fand man heraus, dass der Botenstoff NO durch die Enzymgruppe der NO-Synthasen (NOS) gebildet wird (Palmer et al., 1988). Man unterscheidet bei den NO-Synthasen zwischen drei Isoformen: die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS). Alle Isoformen werden in der Lunge exprimiert (Marczin, 2001). Sie besitzen ähnliche Struktur und Funktion und katalysieren die gleiche Reaktion (Nathan, 1994). Dabei wird NO bei der von NOS katalysierten Reaktion von L-Arginin zu Citrullin unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH freigesetzt (siehe Abbildung 2).



**Abb. 2:** Bildung von NO durch NO-Synthasen (modifiziert, aus Papale et al., 2012)

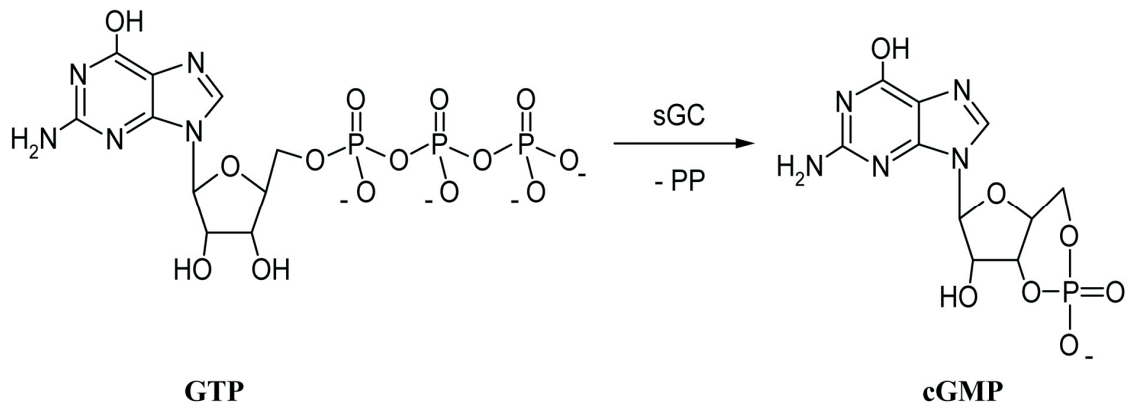
NO besitzt eine kurze Halbwertszeit und diffundiert als Gas aufgrund seiner geringen Molekülgröße durch Membranen. Es liegt als Radikal vor und kann daher schnell chemische Verbindungen eingehen (Stamler, 1992). So reagiert es auch mit seinem endogenen Rezeptor, der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Dabei bindet NO an die prosthetische Häm-Gruppe der sGC. Die Häm-Gruppe liegt in reduzierter Form vor und wird durch NO oxidiert. Die sGC ist aktiviert und synthetisiert aus Guanosintriphosphat (GTP) den second messenger cGMP (Russwurm, 2002).

### **3.4.2 Der second messenger cGMP**

Der second messenger cGMP wird durch Aktivierung der sGC aus GTP gebildet. Durch die Erhöhung der cGMP-Konzentration in der Zelle werden verschiedene cGMP-abhängige Effektorsysteme reguliert. cGMP bindet an bestimmte Zielproteine und beeinflusst somit cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-abhängige Phosphodiesterasen und reguliert Ionenkanäle (Waldmann und Murad, 1987; Stasch, 2003). So steuert cGMP wichtige physiologische Prozesse, wie z.B. die Relaxation und Proliferation von glatten Muskelzellen, die Herzfunktion sowie die Thrombozytenaggregation und -adhäsion. Außerdem ist es an Entzündungsprozessen und der neuronalen Signaltransduktion beteiligt (Bender und Beavo, 2006; Hofmann et al., 2006; Stasch, 2003). Den Abbau des second messengers cGMP zu GMP katalysiert die Enzymfamilie der Phosphodiesterasen (PDE) (Beavo, 1995). GMP selbst weist keine biologische Aktivität auf. Die Konzentration an intrazellulärem cGMP wird also durch das Zusammenspiel von cGMP-bildenden GCs und cGMP-abbauenden PDEs bestimmt.

### **3.5 Die Guanylatzyklen**

Die Guanylatzyklen (GC) wurden in den 1960er Jahren entdeckt und konnte in Zellen, wie z. B. den glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (u. a.: Hardman und Sutherland, 1969; Schultz et al., 1969; White und Auerbach, 1969). Sie gehören wie die Adenylatzyklen (AL) zur Familie der Nuklotidzyklen. Beide katalysieren die Umwandlung vom GTP bzw. ATP zu den dementsprechenden zyklischen Nukleotid, dem cGMP bzw. cAMP (Tesmer und Sprang, 1998).



**Abb. 3:** Guanylatzyklase -vermittelte Umsetzung von Guanosin- 5'-triphosphat (GTP) in zyklisches Guanosin- 3'-5'-monophosphat (cGMP), pp= Pyrophosphat (modifiziert, aus Berg et al., 2007)

Alle Nukleotidzyklasen besitzen eine katalytische Domäne, die sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt. Die Untereinheiten liegen sich in einer Kopf-Schwanz-Formation gegenüber. Die GC werden in die membranständige und die lösliche, zystolische Form eingeteilt.

### 3.5.1 Die membranständige Guanylatzyklase

Es existieren sieben verschiedene Isoformen der membranständigen GC (GC-A - GC-G). Man findet sie in unterschiedlichen Geweben und unterscheidet sie in ihrer Funktion (Kuhn, 2003). Die folgende Tabelle veranschaulicht die verschiedenen Isoformen, ihr jeweiliges Vorkommen im Gewebe, ihre zugehörigen Liganden und schließlich ihre Funktion.

**Tab. 3: Übersicht der verschiedenen membranständigen Guanylatzyklen**

Rezeptor	Lokalisation	Ligand	Funktion
GC-A	glatte Gefäßmuskulatur, Endothel, im zentralen und peripheren Nervensystem, Nebennieren, Nieren, Milz, Herz	ANP, BNP	Senkung des arteriellen Blutdruckes und Hemmung des Wachstums des Herzmuskels
GC-B	Fibroblasten, verschiedene andere Gewebearten	CNP	Gefäßregeneration, Endochondrale Ossifikation
GC-C	Darmepithel, regenerierende Leber	Endotoxin, Guanylin	Erhöhung des intestinalen und renalen Wassers, Transport von Elektrolyten
GC-D	Epithel der olfaktorischen Bahnen	Keine	Geruchserkennung
GC-E	Retina, Epiphyse	keine	das Sehen betreffend
GC-F	Retina	Keine	das Sehen betreffend
GC-G	quergestreifte Skelettmuskulatur	Keine	?

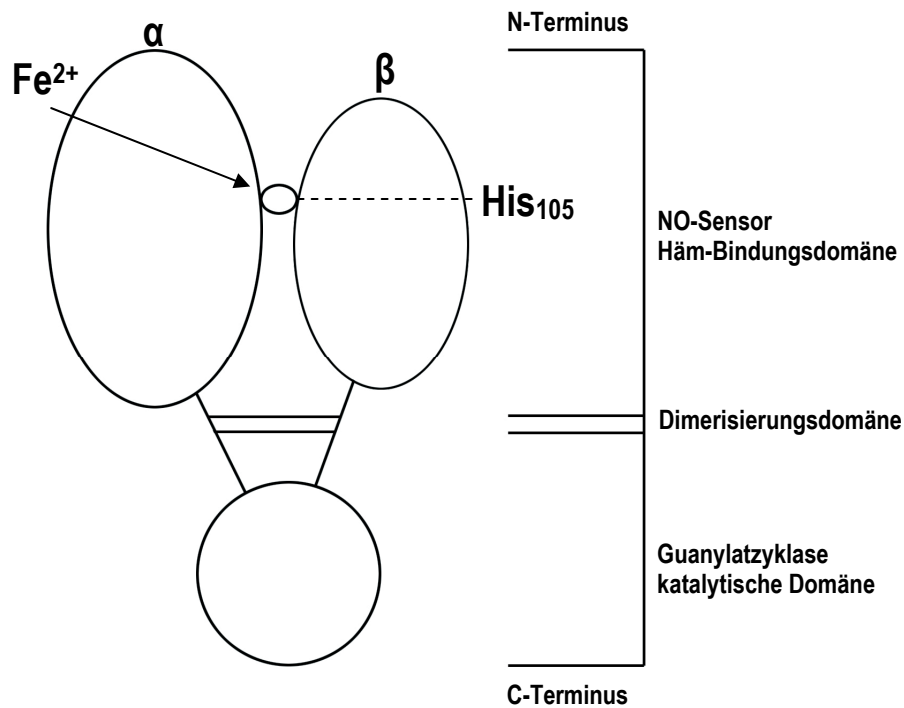
(Tab. 3: nach Kuhn, 2003)

Alle membranständigen GC bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle (die N-terminale Domäne), einer transmembranen Region, die für die Verankerung des Rezeptors in der Membran verantwortlich ist, und einer intrazellulären Domäne. Die membranständige GC kann nicht wie die lösliche GC durch NO stimuliert werden und fungiert als Rezeptor für verschiedene Liganden. Sie aktiviert durch den Anstieg von cGMP verschiedene Effektorsysteme und hat somit Einfluss auf vielfältige, physiologische Funktionen (Kuhn, 2003).

### 3.5.2 Die lösliche Guanylatzyklase

Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) ist ein heterodimeres Enzym, das aus zwei verschiedenen Untereinheiten (alpha- und beta-Untereinheit) besteht, von denen je zwei Isoformen bekannt sind. Somit sind funktionell aktiv nur die Isoformen beta1alpha2 und beta1alpha1 (Kamisaki et al., 1986). Die Untereinheiten bestehen aus drei verschiedenen Domänen (siehe Abbildung 4):

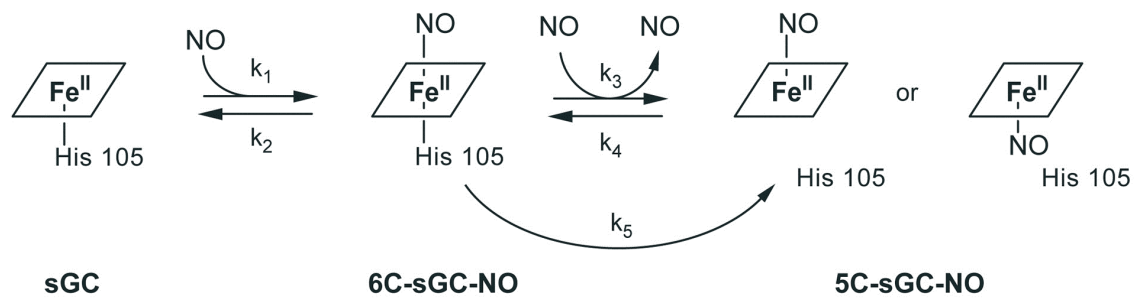
- die N-terminale, Häm-Bindungsdomäne
- die Dimerisierungsdomäne
- die C-terminale, katalytische Domäne



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Aufbaus der löslichen Guanylatzyklase (modifiziert, aus: Schmidt et al., 2003)

Die prosthetische Häm-Bindungsdomäne stellt den NO-Sensor dar (Russwurm und Koesling, 2002; Schmidt, 2003).

NO bindet an die freie Ligandenstelle im Häm-Gerüst, das mit der Aminosäure Histidin 105 durch einen fünffach koordinierten Komplex gebunden ist. Durch die Bindung des NO an die freie Ligandenstelle im Häm-Gerüst entsteht ein sechsfach koordinierter Komplex. Schließlich kommt es durch Aufbrechen der Histidin-Eisen-Bindung zu einer Konformationsänderung in der sGC. Es entsteht ein fünffach koordinierter Nitrosyl-Häm-Übergangskomplex. Die sGC ist somit aktiviert und kann aus GTP den second messenger cGMP bilden (Stone et al., 1995; Schmidt, 2003).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der sGC-Aktivierung (aus: Ballou et al., 2002)

Anzumerken ist, dass die NO-vermittelte Konformationsänderung vom sechsfach zum fünffach koordinierten Komplex den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Die Stimulierung der sGC durch den physiologischen Botenstoff NO führt zu einer zweihundert bis vierhundertfachen Steigerung der Aktivität des Enzyms. Das bedeutet, dass die vorliegende NO-Konzentration nicht nur die Anzahl der aktivierten Enzyme, sondern auch die Geschwindigkeit deren Umsetzung reguliert (Friebe und Koesling, 2003; Mullershausen et al., 2005). Ebenfalls wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass die sGC teilweise mit der so genannten Caveolaemembran assoziiert ist (Zabel et al., 2002). Caveolae sind cholesterinreiche Einstülpungen der Plasmamembran (Melichar, 2002). Auch die eNOS ist in den Endothelzellen mit den Caveolae verbunden (Feron et al., 1996; Prabhakar et al., 2000). Das bedeutet, dass die eNOS als Bildungsstätte von NO und die sGC als NO-Rezeptor eng zueinander liegen. Somit liegt nahe, dass angesichts der kurzen Halbwertszeit von NO der Ablauf dieser NO-vermittelten Signalkaskade gewährleistet ist (Melichar, 2002). Die sGC wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Man findet sie vor allem in Lunge, Gehirn, Thrombozyten und Plazenta (Denninger und Maletta, 1999; Mergia et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung der sGC und damit die katalytische Umwandlung von GTP zu cGMP eine wichtige Regulationsfunktion verschiedener physiologischer Abläufe darstellt, wie z.B. die Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur (Warner et al., 1994), die Inhibition der Plättchenaggregation (Buechler et al., 1994) und die neuronale Signaltransduktion (Jaffrey und Snyder, 1995). Über die Erhöhung der cGMP-Konzentration werden cGMP-abhängige Enzyme (Proteinkinase, Phosphodiesterase) und Ionenkanäle gesteuert.



### **3.6 Oxidativer Stress**

Unter oxidativem Stress versteht man eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Körper. Dieser oxidative Stress ist assoziiert mit zahlreichen Erkrankungen wie z. B. Bluthochdruck und Arteriosklerose (Hare, 2004; Melichar et al., 2004). Zu ROS zählen u.a. Superoxid-Radikale, Hydroxyl-Radikale und Wasserstoffperoxid. Sie werden endogen aus z.B. NADPH-Oxidasen, Xanthinoxidasen und der entkoppelten NOS gebildet (Warnholtz et al., 1999). Eine Erhöhung der ROS-Konzentration führt dazu, dass es zu einer ROS-induzierten Oxidation des zentralen Eisenatoms der prosthetischen Häm-Gruppe kommt, wodurch die NO-sensitive in die NO-insensitive Form der sGC überführt wird. Ausschlaggebend ist, dass ROS als starke Oxidantien wirken. Die Bioverfügbarkeit von NO wird vermindert, indem ROS mit NO zu Peroxynitrit reagiert (Pryor und Squadrito, 1995). Die Oxidation des NOS-Cofaktors Tetrahydrobiopterin durch ROS führt zu einer Entkopplung der NOS. Dadurch wird Superoxid anstelle von NO produziert (Guzik und Harrison, 2006).

Es wird des Weiteren beschrieben, dass unter oxidativem Stress die Expression der sGC vermindert ist. Es kann nur eine geringe Aktivierung der sGC durch NO erfolgen (Bauersachs et al., 1998; Ruetten et al., 1999). Dies alles hat eine Dysfunktion des NO-cGMP-Signalweges zur Folge. Die Aktivierung der sGC ist vermindert, die Produktion an cGMP wird reduziert. Wichtige cGMP-abhängige Effektorsysteme werden beeinträchtigt. Schließlich kommt es zu schweren endothelialen und vaskulären Funktionsstörungen. Koronare Erkrankungen, Bluthochdruck oder Arteriosklerose sind somit erklärbar. Dies verdeutlicht, warum die Suche nach NO-unabhängigen Stimulatoren der sGC in der Forschung auf diesem Gebiet sehr wichtig ist.

### **3.7 NO-unabhängige Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase**

Nachdem der Hauptmechanismus der physiologischen Aktivierung der sGC bekannt war, versuchte man die NO-Konzentration durch NO-freisetzende Substanzen zu erhöhen, um die Aktivierung der sGC durch Bindung des NO zu optimieren (Zhao et al., 1999; Ballou et al., 2002).

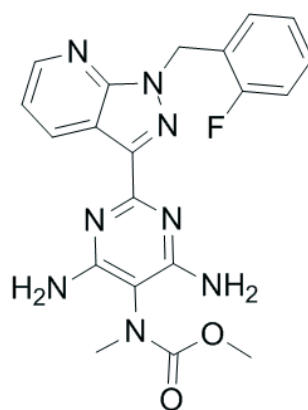
Schon in den siebziger Jahren wurden zur Behandlung der Angina pectoris organische Nitrate, wie z.B. Nitroglycerin, Isosorbitdi- oder Isosorbitmononitrat eingesetzt. Ihre gefäßweitende Wirkung ist Folge der Aktivierung der sGC. Der Mechanismus der Nitratwirkung zeigt einige Nachteile, wie zum Beispiel die schnelle Entwicklung einer Nitrattoleranz bei wiederholter Gabe. Damit stößt die therapeutische Anwendung von organischen Nitraten aufgrund dieser nachlassenden Wirkung an ihre Grenzen.

Mit der Synthetisierung der Substanz YC-1 (3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol) wurde Mitte der neunziger Jahre erstmals eine chemische Verbindung gefunden, die die sGC unabhängig von NO direkt aktiviert. Dadurch kommt es zur Inhibition der Thrombozytenaggregation über eine intrazelluläre cGMP-Erhöhung (Ko et al., 1999; Wu et al., 1995).

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass YC-1 über die Erhöhung des cGMP-Spiegels zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur in vitro führt (Wegener, 1997). Zusätzlich konnte zu dieser direkten sGC-Stimulation ein Synergismus mit NO nachgewiesen werden (Mulsch et al., 1997). Somit ist mit YC-1 eine Substanz entwickelt worden, die die sGC über einen neuen NO-unabhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert (Galle et al., 1999; Lamothe et al., 2004).

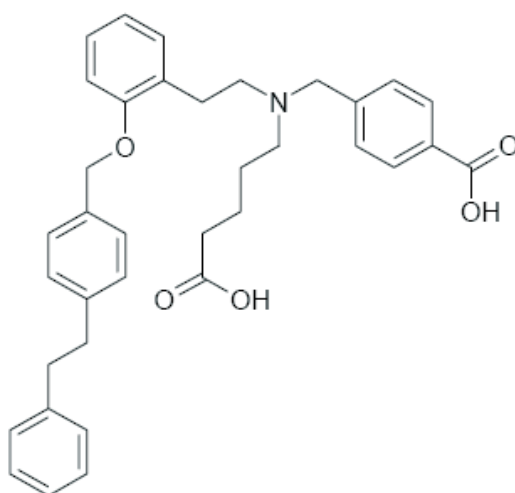
Das Indazolderivat YC-1 diente als Leitstruktur, um später NO-unabhängige und Häm-unabhängige sGC-Stimulatoren zu entwickeln, die eine höhere Wirkstärke als YC-1 besitzen. Stasch et al. identifizierte die Pyrazolopyridin-Derivate BAY 41-2272 und BAY 41-8543, die die sGC NO-unabhängig, jedoch Häm-abhängig stimuliert (Stasch et al., 2001, 2002a, 2002b, 2002 c; Straub et al., 2002). Sie zeigen in Kombination mit NO einen synergistischen Effekt (Schmidt et al., 2004).

Ein weiterer neuartiger Stimulator der sGC ist BAY 63-2521, auch unter dem Produktnamen Riociguat bekannt (s.a Abb. 6a). Er ist ebenfalls ein NO-unabhängiger und Häm-abhängiger Stimulator der sGC und imitiert somit die Wirkung von NO auf die sGC (Schermlay et al., 2008).



**Abb. 6a:** Strukturformel des NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulators BAY 63-2521, aus: Mittendorf et al., 2009

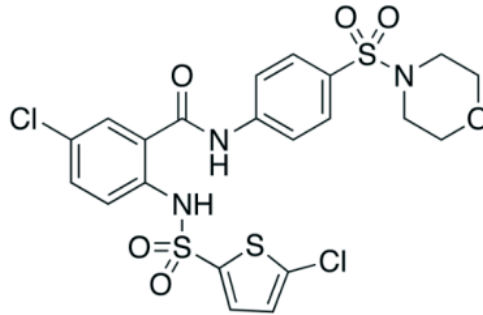
Mit Hilfe des High-Throughput-Screening (HTS) wurde das Aminodicarboxylsäurederivat BAY 58-2667 (s.a. Abb. 6b) gefunden, welches die sGC NO- und Häm-unabhängig aktiviert (Wunder et al., 2005). Es ist heute auch unter dem Produktnamen Cinaciguat bekannt. Charakteristisch für die Substanz BAY 58-2667 ist, dass sie in Kombination mit NO nur einen ergänzenden Effekt auf die sGC-Aktivierung hat. Außerdem aktiviert sie das oxidierte oder Häm-freie sGC-Enzym im Vergleich zum Häm-haltigen stärker (Stasch et al., 2006). BAY 58-2667 kann nicht nur die oxidierte Häm-Gruppe verdrängen, sondern ist auch in der Lage, wenn es in sehr hohen Konzentrationen vorliegt, die reduzierte, stark gebundene prosthetische Häm-Gruppe der sGC zu verdrängen. BAY 58-2667 kann die räumliche Struktur der Häm-Gruppe imitieren (Schmidt et al., 2004).



**Abb. 6b:** Strukturformel des NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivators BAY 58-2667, aus: Stasch et al., 2002c

### 3.8 HMR 1766

Das Anthranilsäurederivat HMR 1766 gehört genauso wie das BAY 58-2667 zu den sGC-Aktivatoren. Seine chemische Strukturformel lautet 5-Chloro-2-[[[(5-chloro-2-thienyl)sulfonyl]amino]-N-[4-(4-morpholinylsulfonyl)phenyl]benzamide (s.a. Abb. 6c) und ist auch unter dem Produktnamen Ataciguat bekannt. Es ist eine Substanz, die die sGC auf eine vergleichbare Weise aktiviert wie BAY 58-2667, nämlich NO- und Häm-unabhängig (Schindler et al., 2006). Strukturell unterscheiden sich die beiden Substanzen jedoch. Schindler et al. zeigte in Experimenten, dass HMR 1766 bevorzugt die oxidierte und damit die an Häm abgebaute sGC aktiviert. Damit zeigt HMR 1766 einen großen Vorteil gegenüber sGC-Stimulatoren, die ihre Wirkung verlieren, sobald das Häm in oxidierte Form vorliegt. In dieser Arbeit wird in 6.3 noch näher auf die Substanz HMR 1766 eingegangen.



**Abb. 6c:** Strukturformel des NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivators HMR 1766, aus: Schindler et al., 2006

### 3.9 Experimentelles Tiermodell für die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie in Mäusen

Um eine pulmonale Hypertonie in Tieren zu erzeugen, wird u. a. die Methode der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie verwendet (Urbanova et al., 1973). Dazu werden Mäuse über einen längeren Zeitraum unter chronische Hypoxie gesetzt. Dies führt zu einer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes um 40-50 %. Der rechte Ventrikel hypertrophiert und erreicht das Doppelte seines Ausgangsgewichtes.

Die pulmonalen Blutgefäße zeigen eine Lumenverengung infolge einer Verdickung der Gefäßmedia (Folkow et al., 1973). Diese ist zum Teil auf eine Hypertrophie der glatten Muskelzellen, jedoch in den meisten Gefäßabschnitten durch eine Zunahme an der Myozytenzahl, also eine Mediahyperplasie, zurückzuführen (Mulvany et al., 1985).

Nicht-muskularisierte Gefäße zeigen eine sogenannte „*de-novo*-Muskularisierung“ und werden zu partiell-muskularisierten Gefäßen umgebaut (Rabinovitch et al., 1979). Man findet die Veränderungen der Lungengefäße auch bei der pulmonalen Hypertonie des Menschen. Ausgelöst werden sie z. B. durch Erkrankungen wie obstruktive Lungenerkrankungen, Pneumonien oder Asthma bronchiale. Auch Menschen, die in großer Höhe wohnen, entwickeln eine pulmonale Hypertonie. Mit zunehmender Höhe nimmt der Luftdruck und damit auch der anteilige Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) ab, der den Sauerstoff in die Lungen presst. Die Luft ist also in großen Höhen „dünner“, d.h der Anteil an Sauerstoff nimmt ab, das Verhältnis der Gase der Luft bleibt aber gleich und beträgt bei Sauerstoff weiterhin 21%. In einer Höhe von 5800 Metern fällt der Sauerstoffpartialdruck

von 760mmHg auf ca. 360mmHg, das entspricht einen Sauerstoffanteil von 10% statt 21% auf Meeresspiegelhöhe.

Mit Hilfe des experimentellen Tiermodells kann zum einen gezeigt werden, dass eine pulmonale Hypertonie und die damit verbundenen hämodynamischen und morphologischen Veränderungen der Lungengefäße und des Herzens durch chronische Hypoxie entsteht. Zum anderen dient es, wie auch in der vorliegenden Arbeit zu sehen ist, dazu, die Einflüsse von verschiedenen Substanzen wie sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren auf das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie zu testen.

### **3.10 Zielsetzung der Arbeit**

Trotz bisheriger vielversprechender Forschungsergebnisse und Behandlungserfolge stellt die PH derzeit immer noch eine unheilbare Erkrankung dar. Alte Behandlungsformen sind symptomatisch und greifen nicht in die pathophysiologischen Gegebenheiten einer PH ein, um die Entstehung oder das Voranschreiten einer PH zu verhindern.

Viele Siganltransduktionswege, die zur Entstehung einer PH führen, sind noch nicht vollständig entschlüsselt. Das Ziel einer modernen Therapie besteht darin, in diesen Siganltransduktionsweg einzugreifen, um eine Blutgefäßerweiterung auszulösen sowie einen strukturellen Gefäßumbau der Pulmonalgefäße aufzuhalten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen neuen Therapieansatz bei Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie mit der Substanz HMR 1766 zu untersuchen. Mit Hilfe eines entsprechenden Mausmodells konnte die Entstehung einer Hypoxie-induzierten PH in der Maus untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob das Präparat HMR 1766, ein Aktivator der sGC, das Krankheitsbild einer Hypoxie-induzierte PH in Mäusen verbessern und einen strukturellen Gefäßumbau in der Lunge aufhalten kann.

Mit Hilfe implantierbarer Blutdrucksensoren sollte die Ausbildung der pulmonalen Hypertonie durch chronische Hypoxie bei Mäusen protokolliert und der Effekt einer Behandlung mit HMR 1766 an diesen erkrankten Mäusen gezeigt werden.

Der sGC-Stimulator Riociguat (BAY 63-2521) ist ein neuartiger Arzneistoff, der zur Behandlung der PH in den USA bereits 2014 zugelassen wurde. Neue Therapieoptionen der PH werden somit auch in Zukunft immer wahrscheinlicher.

HMR 1766 ist als Aktivator der sGC eine interessante Alternative zu dem sGC-Stimulator Riociguat (BAY 63-2521), da es auch die oxidierte Form der sGC aktivieren kann und somit einen Vorteil gegenüber sGC-Stimulatoren aufweist.

In dieser Arbeit war zu untersuchen, ob HMR 1766 somit einen therapeutischen Ansatz im Hinblick auf die pulmonale Hypertonie des Menschen darstellt.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Versuchstiere**

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit C57Bl/6J Mäusen der Firma Charles River aus Sulzfeld (Deutschland) durchgeführt. Die Mäuse waren männlich und wogen zwischen 20 und 25 g. Es befanden sich 1-3 Mäuse in einem Käfig. Sie hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Leitungswasser. Für die Dauer der Experimente wurden sie im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen unter kontrollierten Beleuchtungs- und Temperaturbedingungen gehalten. Die durchgeführten Experimente wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Aktenzeichen GI 20/12 Nr. 35/2004).

#### **4.1.2 Pharmaka und Substanzen**

Folgende Pharmaka und Substanzen kamen in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung:

- Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %, Braun, Melsungen, Deutschland
- Xylazin (Rompun®), Pharmacia, Erlangen, Deutschland
- Ketaminhydrochlorid 100mg/ml (Ketamin®), Pharmacia, Erlangen, Deutschland
- HMR 1766, Guanylatzyklaseaktivator, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland
- Natriumchlorid, Fluka Chemie GmbH, Deutschland
- Kaliumchlorid, Fluka Chemie GmbH, Deutschland

- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Glukose, Fluka Chemie GmbH, Deutschland
- Hydroxyethyl-Särke (HAES), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- Beatmungsgas, 50 % Sauerstoff plus 50 % Stickstoff, Air Liquid, Siegen, Deutschland
- normoxisches Beatmungsgas (21,0 % Sauerstoff, 5,3 % Kohlenstoffdioxid, Rest Stickstoff), Air Liquid, Siegen, Deutschland
- hypoxisches Beatmungsgas (1,0 % Sauerstoff, 5,3 % Kohlenstoffdioxid, Rest Stickstoff), Air Liquid, Siegen, Deutschland
- Enrofloxacin orale Lösung für Kälber (Baytril 2,5 % ®), Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

#### **4.1.3 Verbrauchsmaterialien**

- Einmalspritze 1ml und 2ml (Inject Luer®) Braun, Melsungen, Deutschland
- Kanüle 26 G 0,9 mm x 25 mm (BD Microlance 3®), Becton Dickinson, Deutschland
- Medizinisches Klebeband (Durapore®), 3m, St. Paul, MN, USA
- Zellstofftupfer 5x4 cm (Purzellin®), Lohmann und Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
- Einmalhandschuhe (Transflex®), Ansell, Surbiton Surrey, UK
- Zellulosetücher, Tork, Mannheim, Deutschland
- Chirurgisches Nahtmaterial, Größe 5-0 (Ethibond Excel®), Ehticon GmbH, Norderstedt, Deutschland
- Chirurgisches Nahtmaterial mit Nadel, Größe 5-0 und 6-0 (Prolene™), Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
- Kapillaren, heparinisiert



#### 4.1.4 Geräte und Material für die Tierexperimente

- Computer mit Monitor, Dell GmbH, Frankfurt, Deutschland
- PET-Schläuche mit verschiedenen Durchmessern (Tygon®), Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich
- Druckwandler, Braun, Melsungen, Deutschland
- Beatmungspumpe (SAR 830 A/P Ventilator®) IITH Inc. Life Science Woodland Hills, CA, USA
- Beatmungspumpe Minivet Typ 845, Hugo Sachs Electronics, Harvard apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Rollenpumpe (Ismatech SA, Labortechnik-Analytik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz)
- System der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Kühlung des Wassers des Perfusionssystems, Frigomix®, B Braun, Melsungen, Deutschland
- Temperaturregulator des Wassers des Perfusionssystems, Thermomix®, B Braun, Melsungen, Deutschland
- Drucktransducer, Combitrans 1-fach, B. Braun, Melsungen AG, Deutschland
- 2 Druckmessgeräte für normoxisches und hypoxisches Beatmungsgas, Aalborg Instruments, Orangeburg, New York, USA
- Operationsbesteck, Martin Medizintechnik, Tuttlingen, Deutschland
- Wärmeunterlage (Thermolux®), Witte und Suttor, Murrhardt, Deutschland
- Trachealtubus, aus BD Microlance 3, 15 G gekürzt auf 1,5 cm, Becton Dickinson, Deutschland
- Radiotelemetriesystem (PhysioTel™), Data Science Inc. St. Paul, MN, USA (siehe auch 4.2.12)
- Sensoren für radiotelemetrische Messungen, Modell PA-C-10, Data Science Inc. St. Paul, MN, USA (siehe auch 4.2.12)
- O<sub>2</sub>-Controller Modell 4010, Labotect, Göttingen
- O<sub>2</sub>-Sensor, Labotect, Göttingen
- CO<sub>2</sub>-Absorbent Sodasorb®, Grace, Columbia

- Hämatokrit-Zentrifuge, Adams Autocrit Centrifuge, Adams Parsippany, NY, USA
- Mikroskop MS 5, Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

#### **4.1.5 Geräte und Material für die histologische Auswertung**

- Rotationsmikrotom, vollautomatisch, RM 2165, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Objektträgerstrecktisch, HI 1220, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Paraffinausgussstation, EG 1140 H, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Paraffinstreckbad, HI 1210, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Kühlplatte, EG 1150 C, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat, TP 1050, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Stereomikroskop, DMLA, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Digitalkamera Mikroskop, DC 300 F, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Ethanol 70 %, 95 %, 99,6 %, Fischer, Saarbrücken, Deutschland
- Isopropanol 99,8%, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
- Methanol, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
- Formaldehyd säurefrei  $\geq 37$  %, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Roti-Histol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Xylol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Wasserstoffperoxid 30 %, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Parafilm, American National Can, Measha, WI, USA
- Urinbecher mit Deckel, 100ml
- Deckgläser, 24 x 36 mm, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Universal-Einbettkassetten mit Deckel, in verschiedenen Farben, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Objektträger (Superfrost Plus®), R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

- Microtomklingen S 35, Feather, Japan
- Paraffin Einbettmedium (Paraplast Plus®) Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Pikrinsäure, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
- Eindeckmedium (Pertex®), Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
- Natriumchlorid, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Trypsin (Digest All 2®), Zytomed, Berlin, Deutschland
- Avidin-Biotin-Blocking Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Normal Horse Serum (2,5%), ImmPRESS Kit IgG (anti-rabbit), Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Normal Goat Serum, Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
- Vectastain Elite ABC Kit (anti-rabbit), Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- M.O.M.-Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Biotinylierter Sekundärantikörper, ImmPRESS Kit IgG (anti-rabbit), Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Vector VIP Substrat Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- DAB Substrat Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Methylgrün Counterstain, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland

#### **4.1.6 Antikörper**

- Anti-alpha-smooth muscle actin, Clone 1 A 4, monoklonal, mouse anti-human (Verdünnung 1:900), Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Anti-von-Willebrand-Faktor, polyklonal, rabbit anti-human (Verdünnung 1:900), Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland

#### **4.1.7 Geräte und Software für die Gefäßmorphometrie**

- Computer, Q 550 IW, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Software, Q Win V3, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Makro für den Muskularisierungsgrad (ein eigens für dieses Verfahren entworfenes Programm), Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland

#### **4.1.8 Geräte und Material für das Radiotelemetriesystem**

- PC und Monitor , Dell GmbH, Frankfurt, Deutschland
- Software Dataquest A.R.T Version 3.0, Analysis Software, Data Science Inc. St. Paul, MN, USA
- Receiver, Model RCP, Data Science Inc. St. Paul, MN, USA
- Data Exchange Matrix (Umwandler von analogen in digitales Signal), Data Science Inc. St. Paul, MN, USA
- Ambient Pressure Reference, Model APR, Data Science Inc. St. Paul, MN, USA
- Sensoren für radiotelemetrische Messungen, Modell PA-C-10, Data Science Inc. St. Paul, MN, USA
- biokompatibles Gel, Regel-Syringe 50CC, Data Science Inc. St. Paul, MN, USA
- 2%ige Glutaraldehydlösung, Fluka Chemie GmbH Buchs, Schweiz

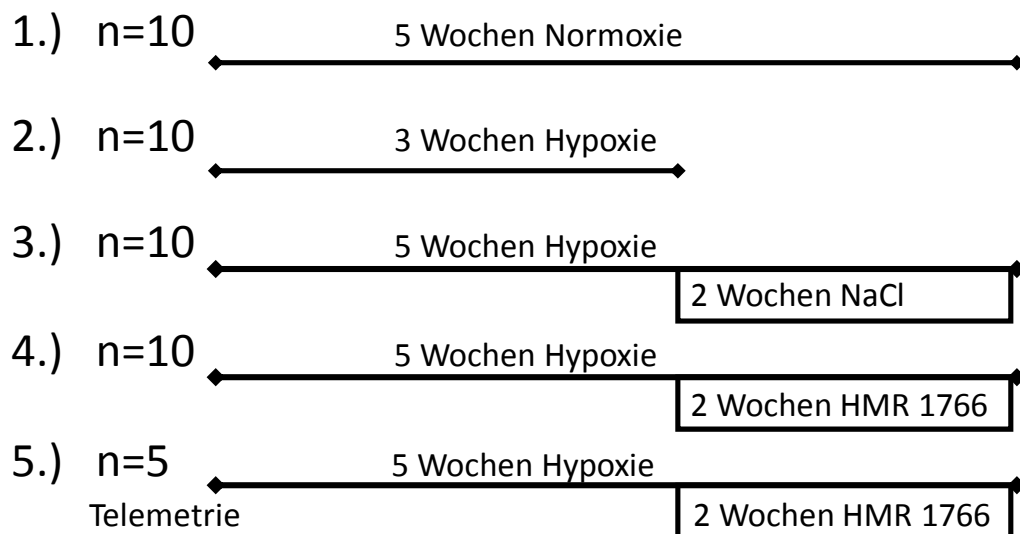
### **4.2 Methoden**

#### **4.2.1 Versuchstiergruppen**

Die Versuchstiere (vgl. 4.1.1) wurden in fünf verschiedene Versuchstiergruppen aufgeteilt. Die Gruppen (1) bis (4) umfassten je 10 Tiere, die Gruppe (5) 5 Tiere.

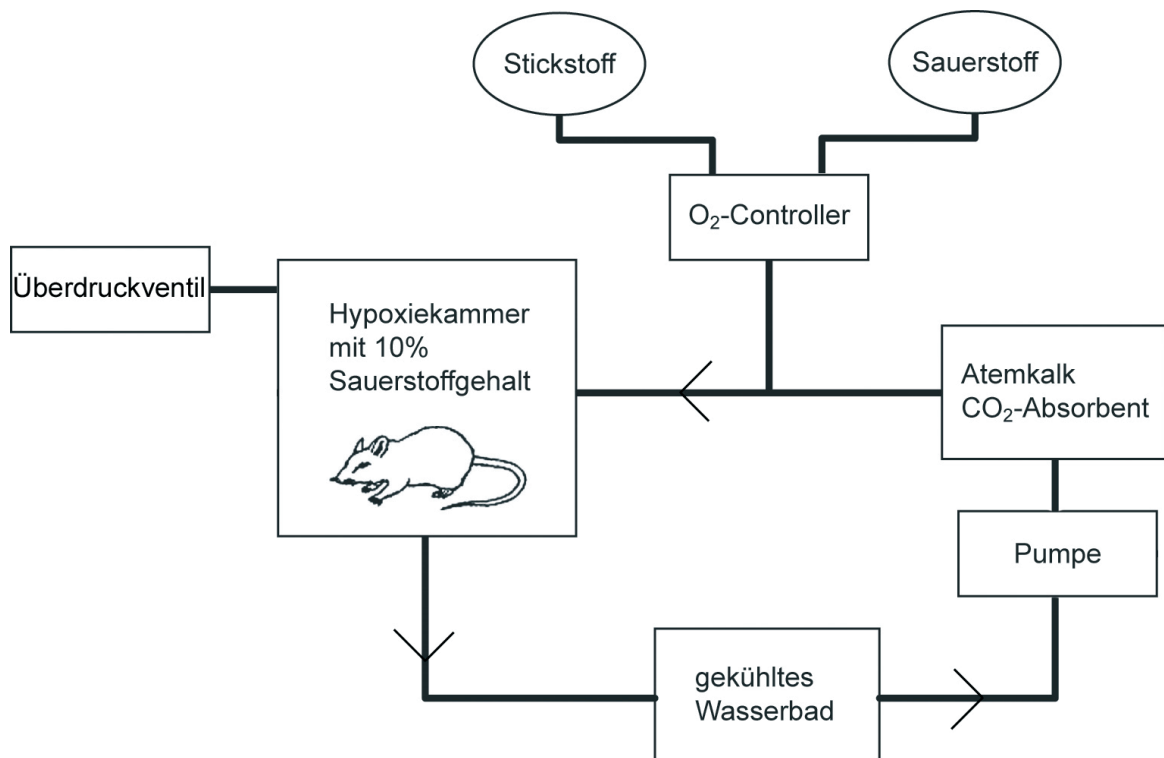
- (1) Mäuse, die 35 Tage unter Normoxie verbrachten (n=10)
- (2) Mäuse, die 21 Tage unter Hypoxie verbrachten (n=10)
- (3) Mäuse, die 35 Tage unter Hypoxie verbrachten und von Tag 21 bis Tag 35 täglich eine subkutane Injektion von NaCl erhielten (n=10)
- (4) Mäuse, die 35 Tage unter Hypoxie verbrachten und von Tag 21 bis Tag 35 einmal täglich mit HMR 1766 behandelt wurden (n=10)
- (5) Mäuse, die wie die Mäuse in Gruppe (4) 35 Tage unter Hypoxie verbrachten und von Tag 21 bis Tag 35 einmal täglich mit HMR 1766 behandelt wurden (n=5), deren rechtsventrikulärer Blutdruck zusätzlich mit Hilfe eines implantierten Transponders telemetrisch zu jeder Zeit gemessen und aufgezeichnet werden konnte (siehe 4.2.12).

Versuchsanordnung schematisch dargestellt:



#### **4.2.2 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie der Maus**

Eine pulmonale Hypertonie entwickelt sich unter Hypoxie. Bei dem Tiermodell der vorliegenden Arbeit wurden C57Bl/6J-Mäuse in Kammern mit 10% Sauerstoffkonzentration und bei normobarem Luftdruck (normobare Hypoxie) über 21 bzw. 35 Tage lang gehalten (siehe Abb. 7). Um die Konzentration des Sauerstoffs konstant zu halten, waren die Kammern mit einer automatisch regulierenden Kontrolleinheit verbunden (O<sub>2</sub>-Controller, Model 4010, Labotect, Göttingen, Deutschland). Es wurde automatisch mit einem Sensor die Gaskonzentration gemessen und entsprechend Stickstoff bzw. Sauerstoff hinzugefügt. Die durch das Halten der Tiere in diesen Kammern entstandene Luftfeuchtigkeit wurde über Kondensation in einem gekühlten Wasserbad reduziert. Das abgeatmete CO<sub>2</sub> der Versuchstiere musste über den Atemkalk (Sodasorb®, CO<sub>2</sub>-Absorbent, Grace, Columbia) herausgefiltert werden. Die Sauerstoff-Kontrolleinheit, das gekühlte Wasserbad und der Atemkalk waren über PET-Schläuche mit den Kammern verbunden und stellten einen abgeriegelten geschlossenen Kreislauf dar, entstehender Überdruck durch das Zufügen der Gase wurde mit einem Niveau von 1cm Wassersäule reduziert. Die Kammern wurden einmal pro Tag für die Säuberung der Käfige sowie zur Futter- und Wasserbereitstellung geöffnet. Die Temperatur in den Kammern betrug durchgehend 22-24°C. Die Beleuchtung war in einen 12-Stunden-Tag-12-Stunden-Nacht-Rhythmus eingestellt. Die Kontrollgruppen wurden in den beschriebenen Kammern unter 21% Sauerstoffkonzentration, das der Konzentration an Sauerstoff in der Umgebungsluft entspricht, gehalten. Alle anderen Bedingungen und Gegebenheiten waren exakt gleich.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie, die Pfeile geben die Strömungsrichtung an

#### 4.2.3 Medikamentenapplikation

Es wurde aus der Substanz HMR 1766 von Sanofi-Aventis eine Injektionslösung hergestellt. Dazu wurde 1 mg der Substanz mit 1 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung hinzugegeben und zu einer Suspension vermischt. Da HMR 1766 wasserunlöslich ist, war es wichtig, vor jeder Applikation die Suspension gut aufzuschütteln und zügig subkutan in eine Hautfalte in der Flankengegend zu injizieren. Eine Gewebeunverträglichkeit wurde in keinem Fall beobachtet. Die Mäuse, die der Hypoxie ausgesetzt waren, erhielten zwischen dem 21. und dem 35. Tag eine tägliche Injektion von 10mg/kg Körpergewicht HMR 1766. Das entsprach bei einem Körpergewicht von 20g einem Injektionsvolumen von 0,2 ml der oben beschriebenen Suspension.

Jede Maus der hypoxischen Kontrollgruppe erhielt zwischen Tag 21 und Tag 35 eine tägliche Injektion von 0,2ml NaCl subkutan.

#### **4.2.4 Rechtsventrikuläre hämodynamische Messungen**

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemisches (50µg Ketamin/g / 10µg Xylazin/g) anästhesiert. Vor dem Beginn der chirurgischen Präparation wurde die erforderliche Narkosetiefe anhand des Ausfallens des Flexorreflexes durch Kneifen mittels einer Pinzette im Zwischenzehnbereich sichergestellt. Nach Verlust der Reflexe wurden die Mäuse auf eine Wärmematte (Thermolux®, Witte und Suttor, Murrhardt, Deutschland) verbracht, um die physiologische Körpertemperatur zu gewährleisten. Nach der Hautdesinfektion des Halsbereiches mit Braunol wurde eine ca. 1cm lange Inzision der Haut in der Medianen des Halsbereiches vorgenommen. Die Trachea wurde vorgelagert und tracheotomiert. Die Tiere wurden daraufhin mit einer Beatmungspumpe (SAR 830 A/P Ventilator®, IITH Inc. Life Science Woodland Hills, CA, USA) mit einem Atemvolumen von 10ml/kg Körpergewicht und einer Frequenz von 120 Atemzügen/Minute automatisch beatmet. Um einen Zugang zum Thorax zu erlangen, wurde nach einem Hautschnitt in der Linea alba ein Zugang in das craniale Abdomen geschaffen. Das Diaphragma wurde dargestellt und die Brusthöhle durch Inzision des Zwerchfells eröffnet. Um eine ausreichende Sicht in die Brusthöhle zu erhalten, wurde das Diaphragma von den Rippen und dem Brustbein gelöst. Als letztes wurde ein flüssigkeitsgefüllter Katheter, der mit einem Druckwandler (Braun, Melsungen, Deutschland) verbunden war, in den rechten Ventrikel verbracht. Der rechtsventrikuläre Blutdruck ließ sich somit aufzeichnen und die Ergebnisse wurden gespeichert. Vor jeder Messung wurde das Messsystem kalibriert.

#### **4.2.5 Messung des Hämatokritwertes**

Nach der Untersuchung der hämodynamischen Parametern wurden die Mäuse, wie in 4.2.6 beschrieben, unter tiefer Narkose durch Entbluten mittels einer Inzision der Arteria carotis getötet. Dabei wurden 40 µl Blut mit Hilfe einer heparinisierten Kapillare aufgefangen. Die Bestimmung des Hämatokritwertes erfolgte durch die Hämatokritzentrifuge (Adams Autocrit Centrifuge, Adams Parsippany, NY, USA).



#### 4.2.6 Probenentnahme der Lunge

Nach Tötung der narkotisierten Tiere durch Entblutung wurden sie in Rückenlage fixiert. Es wurden Blutproben aufgefangen, welche bei 4°C über 10 Minuten bei einer Umdrehungszahl bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurden. Das überstehende Plasma wurde abgezogen und für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Auch Blutproben zur Bestimmung des Hämatokritwertes wurden aufgefangen (siehe 4.2.5).

Die Trachea wurde mit der Hilfe einer stumpfen gebogenen Pinzette erneut unterminiert und vorgelagert. Der für die künstliche Beatmung zuvor eröffneten Trachea wurde aus einer Kanüle (BD Microlance 3'15 G gekürzt auf 1,5 cm) ein angefertigter Trachealtubus eingeführt und mit chirurgischem Nahtmaterial der Größe 5-0 fixiert.

Durch die in 4.2.4 vorgenommene Ablösung des Diaphragmas von der Brustwand war es möglich, vom Abdomen aus die Pleurahöhle ohne Verletzung der Lungenlappen darzustellen. Schließlich wurde der Thorax in der Medianen durch eine Sternotomie eröffnet. Der Thymus und der Herzbeutel wurden entfernt. Nach Aufsuchen des rechten Ventrikels wurde dieser eingeschnitten, eine mit einem Schlauch verbundene präparierte Kanüle (ebenfalls eine BD Microlance 3'15 G gekürzt auf 1,5 cm) durch die Öffnung der Arteria pulmonalis eingeführt und hier mit chirurgischem Nahtmaterial der Größe 5-0 fixiert. Der linke Ventrikel wurde inzidiert. Über den mit der Kanüle verbundenen Schlauch wurde über die Arteria pulmonalis mit steriler isotoner Kochsalzlösung und mit einem konstanten Druck von 22 cm Wassersäule das restliche Blut aus den Lungengefäßen gespült. Danach wurde der blutleere linke Lungenlappen am Hilus mit chirurgischem Nahtmaterial ligiert und aus der Brusthöhle entnommen. Wie die Plasmaproben wurde der linke Lungenlappen im flüssigen Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren. Die restlichen Lungenlappen wurden über die Trachea mit steriler isotoner Kochsalzlösung und mit einem konstanten Druck von 11 cm Wassersäule zur Entfaltung gebracht. Desweiteren wurde über die Arteria pulmonalis die blutleeren Lungenlappen für 20 Minuten mit Zamboni's Fixativ (2% iges Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer mit 15% Pikrinsäure, der pH liegt bei 7,3 bis 7,4; Stefanini, De Martino und Zamboni, 1967) und mit einem konstanten Druck von 22 cm Wassersäule durchspült. Die Lungenlappen wurden entnommen und für weitere 8 Stunden in einem Gefäß mit Zamboni's Fixativ bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die fixierten Lungenlappen

in ein Gefäß mit 0,1 M PBS (Phosphatpuffer) umgesetzt und bis zur weiteren histologische Untersuchung bei 4°C gelagert.

#### **4.2.7 Probenentnahme und Präparation des Herzens**

Das Herz wurde aus der Brusthöhle entnommen und die Vorkammern und Herzklappen abgesetzt. Der rechte Ventrikel wurde vom linken Ventrikel und vom Septum getrennt. Rechter Ventrikel (RV) und linker Ventrikel inklusive Septum (LV+S) wurden über vierzehn Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde aus ihren Trockenmassen die Herzratio, d.h. das Gewichtsverhältnis aus RV zu LV+S bestimmt.

Diese Methode wird zur Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie verwendet (Fulton et al. 1952) und ist damit auch ein Parameter zur Beurteilung einer pulmonalen Hypertonie.

#### **4.2.8 Vorbereitung des Gewebes auf histologische und immunhistochemische Analysen**

Die Lungen wurden wie in 4.2.6 beschrieben präpariert. Nach der Lagerung in PBS wurden die Lungenlappen voneinander getrennt und jeder Lungenlappen in einer Einbettkassette platziert. Anschließend wurden die Lungenlappen in dem geschlossenen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Modell TP1050, Leica Microsystems, Nussloch) entwässert. Danach wurden sie durch die Paraffinausgussstation (Modell EG 1140 H, Leica Microsystems, Nussloch) in Paraffin eingegossen und hinterher auf der Kühlplatte (Modell EG 1150 C, Leica Microsystems, Nussloch) heruntergekühlt. Aus diesen Paraffinblöcken wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf Objektträger verbracht wurden. Zur Trocknung und Lagerung verblieben diese Schnitte bei 37°C in einem Wärmeschrank.

Um nun den vorhandenen Muskularisierungsgrad der unterschiedlich großen Lungengefäße zu bestimmen, wurde mit der speziellen Doppelfärbung gegen alpha smooth muscle actin und gegen von-Willebrand-Faktor (Faktor VIII) gefärbt.

Mit dieser Färbung werden die glatten Muskelzellen und das Endothel der Lungengefäße hervorgehoben und können somit leichter zur Analyse herangezogen werden.

#### 4.2.9 Immunhistochemische Doppelfärbung gegen alpha smooth muscle actin und gegen von-Willebrand-Faktor VIII

Die 3µm dicken Lungenschnitte wurden vor der Färbung entparaffiniert und rehydriert. Es wurde zwischen den Schritten jeweils 3x5 Minuten mit PBS gewaschen. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit Serum wurde keine Waschung durchgeführt. Die Antikörper wurden mit einem Histopuffer (PBS mit 3% bovinem Serumalbumin und 0,2% Triton X100) verdünnt.

**Tab. 4: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Doppelfärbung gegen alpha actin und von-Willebrand-Faktor VIII**

Inkubationsdauer (Min.)	Reagenz	Anmerkung
15	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Methanol Gemisch 3% (Ansatz: 180 ml Methanol + 20 ml 30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Block endogener Peroxidasen
10	Trypsin Digest All <sup>®</sup> 1:3	Proteolytische Demaskierung
15	Avidin Blocking Reagenz	Block endogenen Avidins
15	Biotin Blocking Reagenz	Block endogenen Biotins
60	M.O.M. Mouse IG Blocking Reagenz (2 Tropfen M.O.M. Mouse IG Blocking Reagenz zu 2,5 ml PBS)	Block unspezifischer Bindungen
5	M.O.M. Diluent/Proteinblocking (7,5 ml PBS + 600 µl Protein Konzentrat)	Proteinblocking
30	Primärantikörper 1:900 Verdünnung mit	Anti-alpha smooth muscle actin

	Histopuffer	
10	M.O.M. biotinyliertes IgG Reagenz	biotinylierter Sekundärantikörper
5	Vector M.O.M. Kit ABC Reagenz	Vectastain ABC Elite Kit
3 – 4	Vector VIP <sup>®</sup> Substrat Kit	violettes Chromogen
15	Avidin Blocking Reagenz	Block endogenen Avidins
15	Biotin Blocking Reagenz	Block endogenen Biotins
30	Blocking Serum (50% Ziegenserum + 50% Histopuffer)	Block unspezifischer Bindungen mit Serum
30	Primärantikörper 1:900 Verdünnung mit Histopuffer	anti-von-Willebrand-Faktor (aus Kaninchen)
30	Vectastain ABC Elite Kit anti-rabbit (aus Ziege)	biotinylierter Sekundärantikörper
30	Vector M.O.M. Kit ABC Reagenz	Vectastain ABC Elite Kit
40 sek.	Vector DAB <sup>®</sup> Substrat Kit	braunes Chromogen
3 – 5	Methylgrün	Gegenfärbung der Zellkerne

Als letztes wurden die Lungenschnitte dehydriert und mit Pertex<sup>®</sup>, einem synthetischen, xylollöslichen Deckglasklebmittel bedeckt.

#### **4.2.10 Durchführung der morphometrischen Auswertung der Lungengefäße (Morphometrie der Lungengefäße)**

Nachdem die 3µm dicken Schichten mit der immunhistochemischen Doppelfärbung gegen alpha smooth muscle actin und gegen von-Willebrand-Faktor gefärbt wurden, wurde zur Auswertung des Muskularisierungsgrades der Lungengefäße ein von Leica entwickeltes

Computerprogramm verwendet. Hierzu wurde der Anteil der anti-alpha Aktin gefärbten Bereiche in der Gefäßmedia der Lungengefäße bestimmt. Dieser Anteil wurde durch die Färbung (Vector VIP<sup>®</sup> Substrat Kit) violett dargestellt. Nicht muskularisierte Gefäße wurden aufgrund der braunen Färbung (anti-von-Willebrand-Faktor) des Endothels kenntlich gemacht und konnten somit von partiell bzw. voll muskularisierten Gefäßen unterschieden werden. Je größer der Anteil von alpha smooth muscle actin positiven Bereichen in der Gefäßmedia war, desto stärker war das Gefäß muskularisiert. Zusätzlich bestimmte das Computerprogramm den Gefäßdurchmesser.

Die 3µm dicken Schnitte wurden vor der Auswertung geblindet, damit keine Rückschlüsse auf die verschiedenen Tiergruppen geschlossen werden konnten. Die Gefäße wurden bei 400facher Vergrößerung untersucht und in drei verschiedene Größen eingeteilt:

- kleine Gefäße (20-70 µm Durchmesser)
- mittlere Gefäße (71-150 µm Durchmesser)
- große Gefäße (> 150 µm Durchmesser)

Desweiteren wurden die unterschiedlichen Gefäße anhand ihres Muskularisierungsgrades kategorisiert. Dieser wurde mit dem von Leica entwickeltem Programm durch eine colorimetrisch-spektrometrischen Rechnung bestimmt und wie folgt eingeteilt:

- nicht muskularisiert (< 5 % violetter Anteil von alpha smooth muscle actin gefärbten Bereichen in der Gefäßmedia)
- partiell muskularisiert (5-75 % violetter Anteil von alpha smooth muscle actin gefärbten Bereichen in der Gefäßmedia)
- voll muskularisiert (> 75 % violetter Anteil von alpha smooth muscle actin gefärbten Bereichen in der Gefäßmedia)

Bei einer 400 x fachen Vergrößerung wurden 80 kleine, 15 mittlere und 5 große Gefäße gezählt und je nach ihrem Muskularisierungsgrad in eine der drei genannten Kategorien sortiert. Schließlich wurde der Prozentsatz der Gefäße in den einzelnen Muskularisierungsgruppen errechnet.

#### **4.2.11 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge**

Das Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (Weissmann et al., 2004) bietet die Möglichkeit, die hypoxische pulmonalarterielle Vasokonstriktion (HPV) zu untersuchen und den Einfluss pharmakologischer Substanzen über den vaskulären Zugangsweg auf die isolierte Lunge zu testen. Sowohl physiologische als auch pathologische Gegebenheiten können gezielt in der isolierten Mauslunge untersucht werden.

Die Auswirkungen von HMR 1766 auf die akute hypoxische pulmonalarterielle Vasokonstriktion (HPV) wurde am Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge der Maus (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten Deutschland) untersucht.

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemisches (50µg Ketamin/g / 10µg Xylazin/g) anästhesiert. Die Narkosetiefe wurde mit der Überprüfung des Zwischenzehenreflexes getestet. In tiefer, schmerzfreier Narkose konnte mit der Präparation begonnen werden.

Nachdem eine Inzision an der Halsunterseite der Haut gesetzt wurde, wurde nach vorsichtigem stumpfem Präparieren die Trachea aufgesucht. Nach einer Tracheotomie wurde der Tubus in der Trachea fixiert und mit der Beatmungspumpe Minivet Typ 845 (Hugo Sachs Electronics, Harvard apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) verbunden. Die Lungen der Mäuse wurden mit einem Atemzugvolumen von 300 µl/Atemzug und einer Frequenz von 90 Atemzügen/Minute automatisch mit Raumluft ventiliert.

Um eine freie Sicht zum Brustkorb zu schaffen, wurde eine sternal durchgeführte Thorakotomie durchgeführt. Hierzu wurde durch eine Inzision der Linea alba ein Zugang zur Bauchhöhle geschaffen. Das Diaphragma wurde unter vorsichtiger Präparation entfernt und der Brustkorb unter Schonung von Lunge und Herz sternal geöffnet. Die Rippen wurden aufgebogen und seitlich befestigt. Anschließend wurde zunächst ein Katheter in der Pulmonalarterie platziert. Damit durch den beginnenden einfließenden Perfusatfluss es nicht zum Rückstau vom linken Ventrikel in die Lungengefäße kam, wurde der linke Ventrikel durch einen kleinen Schnitt eröffnet, damit das Perfusat abfließen konnte. Nach Abtrennung des Unterleibes der Maus zur besseren Durchführung der Perfusion wurde nun der 2. Katheter im linken Ventrikel fixiert, um somit den Perfusionskreislauf zu schließen.

Die Technik der Ventilation und Perfusion der isolierten Lunge wurde schon früher im Detail beschrieben. Sie wurde 1994 an Kaninchenlungen etabliert (Weissmann et al., 1995) und 2004 auf die Lunge der Maus übertragen (Weissmann et al., 2004).

Die Ventilationsparameter für die durchgeführten Versuche setzten sich wie folgt zusammen: Die Lungen der Mäuse wurden mit einem Tidalvolumen von 300  $\mu$ l/Atemzug und einer Frequenz von 90 Atemzügen/Minute ventiliert. Der positive-endexpiratorische Druck (PEEP) wurde auf 3 cm H<sub>2</sub>O eingestellt. Die Beatmung wechselte je nach Versuchszweck zwischen normoxischem Gas (21,0% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) und hypoxischem Gas (1,0% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>).

Die Perfusion wurde in einem geschlossenen und rezirkulierenden System durchgeführt (siehe Abb. 8). Die Temperatur wurde mit 37°C konstant aufrecht gehalten. Die Temperierung wurde mit Hilfe einem Frigomix und einem Thermomix der Firma B. Braun gewährleistet. Um Luftembolien auszuschließen, wurde das Schlauchsystem sorgfältig vor Beginn der Präparation entlüftet. Die Perfusion erfolgte mit einem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer mit folgender Zusammensetzung:

120,0 mM Natriumchlorid  
2,4 mM Kaliumchlorid  
1,1 mM Kaliumdihydrogenphosphat  
5,0 mM Glukose  
50g/l Hydroxyethyl-Stärke (HAES)

Durch Zugabe von 8,4 prozentigem Natrium-Bicarbonat und anschließender Begasung des Perfusats mit normoxischem Gas wurde ein pH von 7,3 bis 7,4 eingestellt. Der Perfusatfluss wurde über die Peristaltikpumpe auf einen konstanten Wert von 2 ml/min eingestellt. Das Gesamtvolumen im rezirkulierenden Perfusat betrug 12 ml.

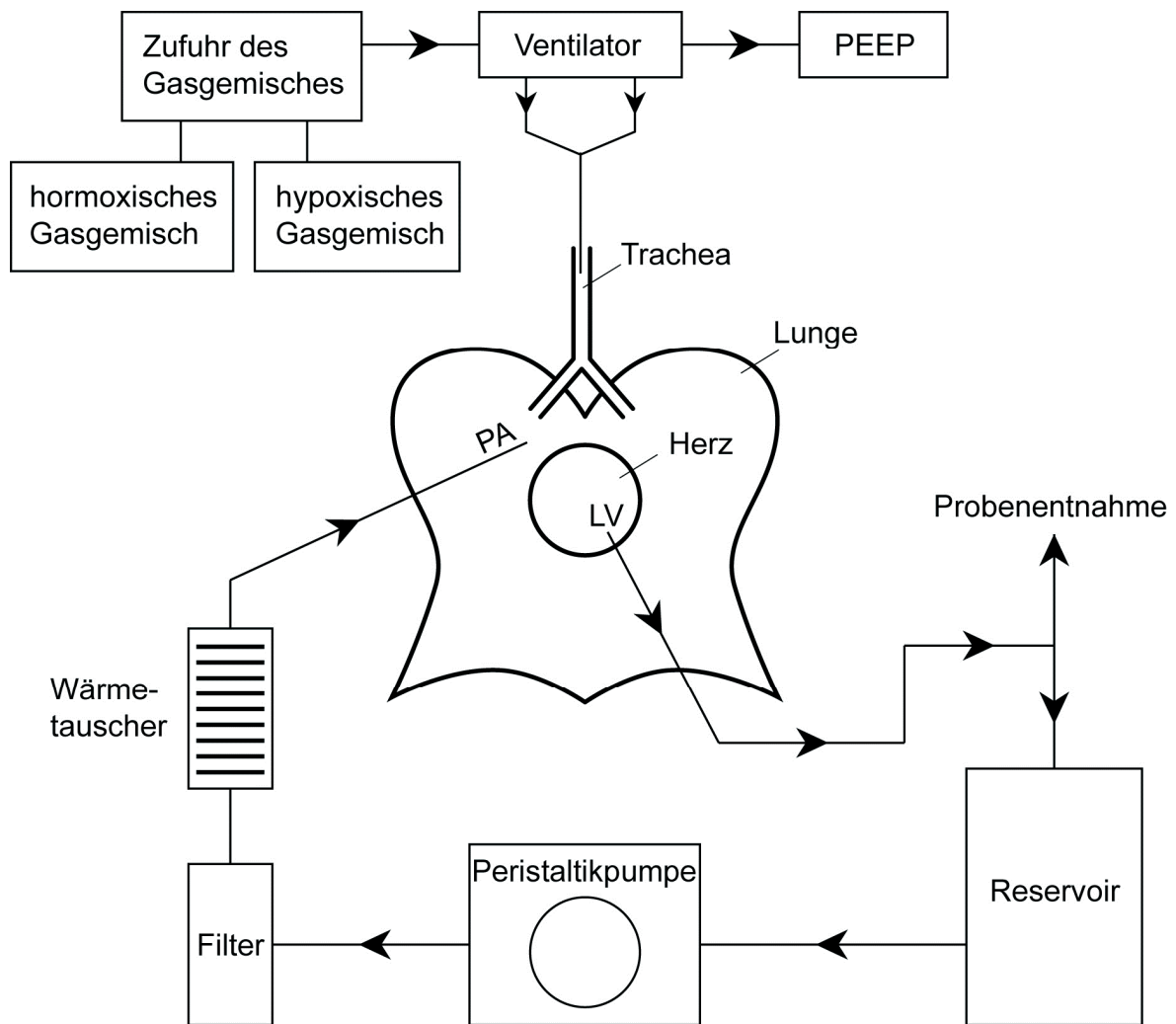
Mit Hilfe der Peristaltikpumpe (Ismatech SA, Labortechnik-Analytik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) gelangte die Perfusionslösung vom Reservoir zu dem Wärmeaustauscher, um anschließend über den in der Pulmonalarterie (PA) fixierten Katheter die Lungenstrombahn zu passieren. Am Übergang in die Pulmonalarterie wurde der pulmonalarterielle Blutdruck (PAP) von einem Druckabnehmer (Drucktransducer, Combitrans 1-fach, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) gemessen. Nach Durchfluss der Lungenstrombahn erreichte das Perfusat den linken Ventrikel (LV). Über den fixierten

2. Katheter im linken Ventrikel wurde der Perfusionskreislauf geschlossen. Das Perfusat wurde in das Reservoir zurückgeleitet.

Der über den Druckabnehmer gemessene PAP wurde über einen Analog-Digitalumwandler digitalisiert und auf einen Personalcomputer gespeichert. Diese Daten konnten jederzeit zur weiteren Analyse herangezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit bestand der Versuchsmodus aus dem Wechsel von 10 Minuten andauernden hypoxischen (1% Sauerstoff) und 15 Minuten andauernden normoxischen (21% Sauerstoff) Beatmungsphasen. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen von HMR 1766 auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV), ausgelöst durch wiederholende hypoxische Beatmungsphasen, wurden aufgezeichnet. Die Lösungen mit HMR 1766 wurden in der Dosisreihe von 0,1 bis 10,0  $\mu\text{M}$  jeweils 5 Minuten vor jeder hypoxischen Beatmungsphase in den Perfusatbehälter gegeben. Die hypoxischen und normoxischen Kontrolllungen erhielten nur das Lösungsmittel (DMSO).





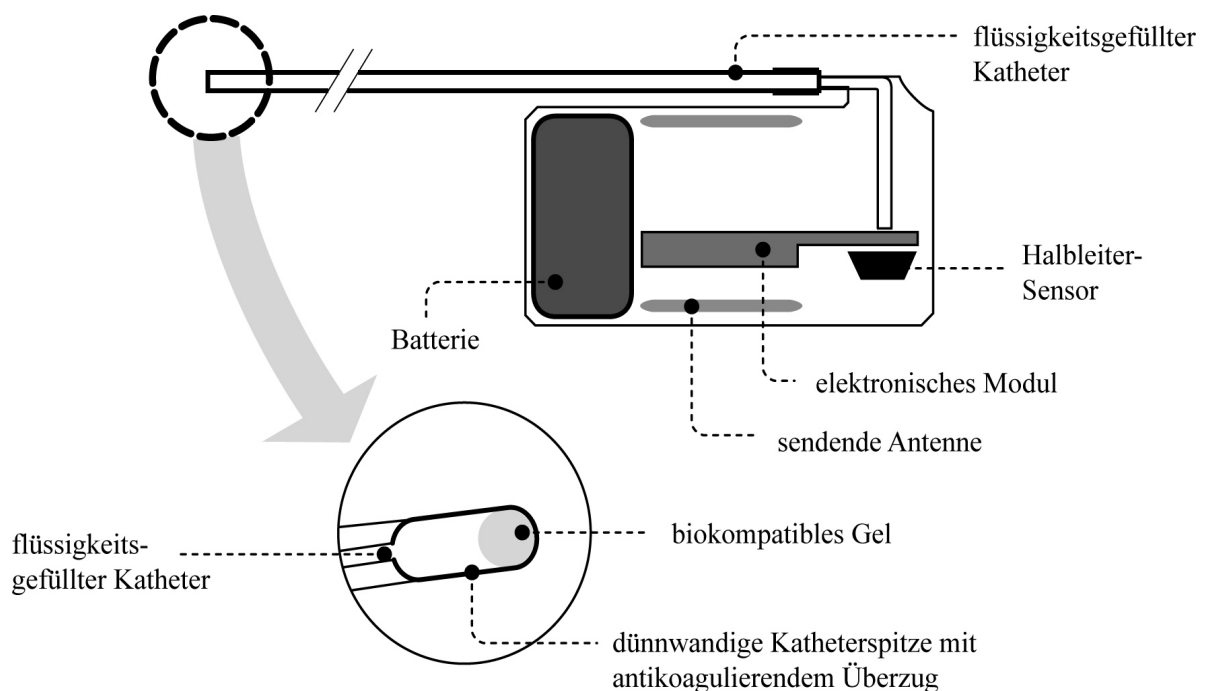
**Abb. 8:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge: die Lunge wird über eine Ventilationspumpe mit dem Gasgemisch beatmet. Die gesamte Lungenstrombahn wurde mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung von der Pulmonalarterie bis zum linken Ventrikel perfundiert. LV: linker Ventrikel, PA: Pulmonalarterie, PEEP: Einstellung des positiv-endexpiratorischen Druckes.

#### 4.2.12 Telemetrie

Die Methode der Implantation telemetrischer Sensoren in Labormäusen bietet die Möglichkeit der kontinuierlichen Messung verschiedener Parameter (z.B. Messung des Blutdruckes) über den gesamten Zeitraum der Experimente am wachen, nicht

narkotisierten und frei beweglichen Tier. Die Verfälschung der gemessenen Parameter durch störende Faktoren wie z.B. Stress oder Narkose wird somit vermieden.

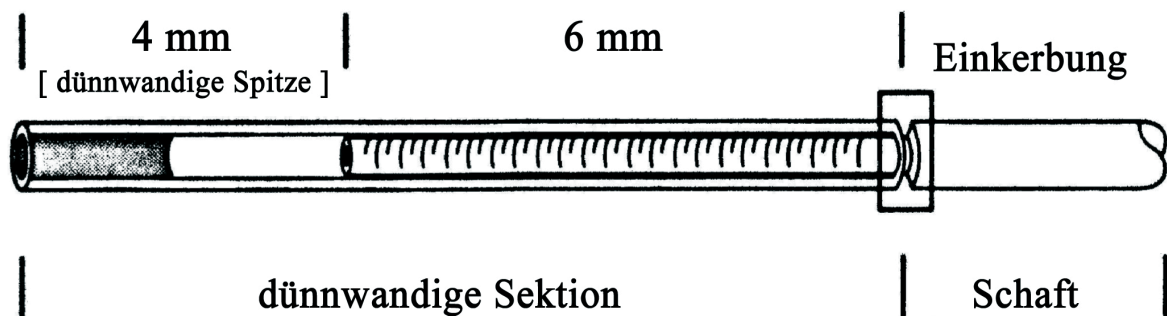
Der zu implantierende Transmitter hat ein Volumen von 1,1 cm<sup>3</sup> und ein Gewicht von 1,4g und dient zur Messung des systemischen, pulmonalarteriellen oder rechtsventrikulären Blutdruck. Er ist wie folgt aufgebaut:



**Abb. 9:** Schematische Darstellung des implantierbaren Sensors (modifiziert, aus Kramer K, Applications and Evaluation of Radio-Telemetry in Small Laboratory Animals, 2001)

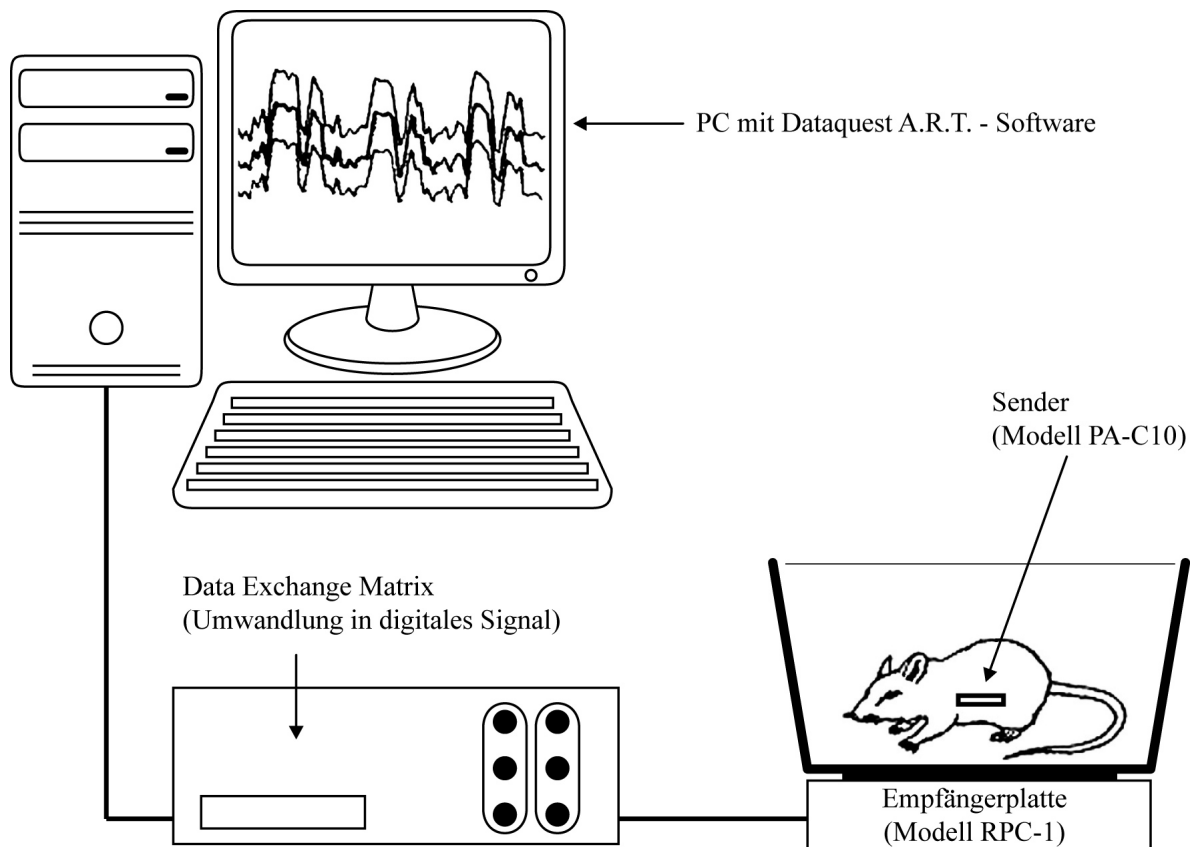
Der implantierbare Transmitter wird von einem silikonartigen Elastomer umgeben und besteht aus mehreren Komponenten:

- Der Blutdrucksensor detektiert den Blutdruck von der Spitze des Katheters und sendet die Signale an das elektronische Modul.
- Das elektronische Modul wandelt die Blutdruckwerte in ein digitales Signal um und überträgt dieses an den Empfänger.
- Die Batterie versorgt das elektronische Modul mit Energie.
- Der Katheter dient als Fühler für den Blutdruck. Er ist 5 cm lang und besteht aus Polyurethan. Gefüllt ist die Katheterspitze mit einer nicht komprimierbaren Flüssigkeit, die die Blutdruckfluktuationen an den Transmitter weiterleitet. Zusätzlich enthält sie ein biokompatibles Gel, welches die nicht komprimierbare Flüssigkeit schützt und verhindert, dass Blut an der Katheterspitze gerinnt.



**Abb. 10:** Schematische Darstellung der Katheterspitze, die eine Art Abtastregion für den zu messenden Blutdruck zeigt (modifiziert, aus Data Sciences International, PA device surgical manual for mice, 1999)

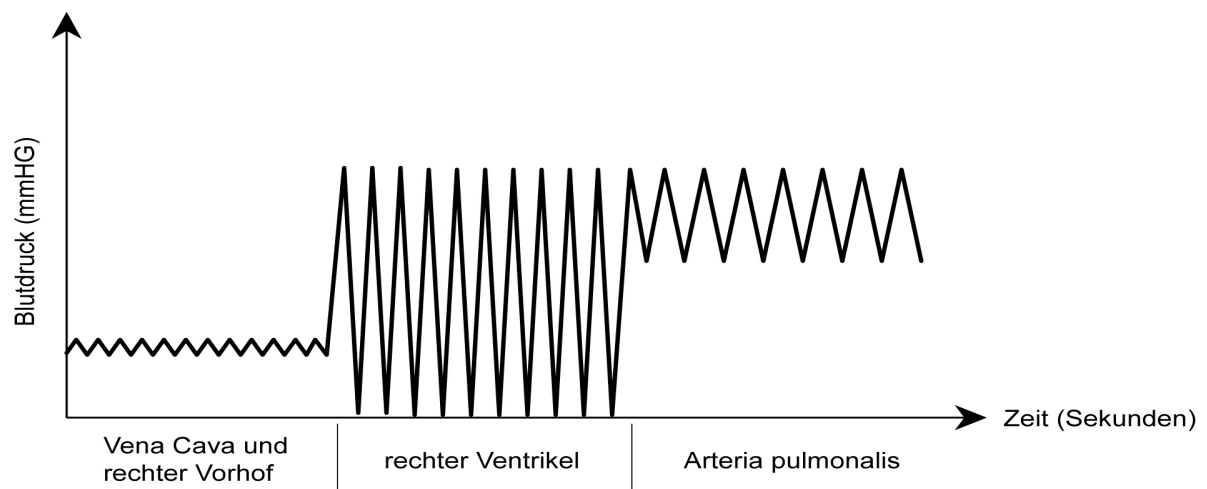
Das digitalisierte Signal wird vom Transmitter als Radiosignal zur Empfängerplatte (Modell RPC-1) gesendet, von dort über ein zwischengeschaltetes Gerät (Data exchange matrix), welches das empfangene Radiosignal in ein visuelles Signal umwandelt, schließlich an den Computer weitergeleitet. Mit der speziellen Software von Dataquest A.R.T.2.1 lassen sich die empfangenen Daten weiter analysieren (siehe Abb. 11).



**Abb. 11:** Schematische Darstellung des telemetrischen Versuchsaufbaus zur Messung des rechtsventrikulären Blutdruckes (modifiziert, aus Kramer K, Applications and Evaluation of Radio-Telemetry in Small Laboratory Animals, 2001)

In der vorliegenden Arbeit wurde der rechtsventrikuläre Blutdruck bei C57Bl/6J-Mäusen mit Hilfe des beschriebenen implantierbaren Sensors (Dataquest A.R.T.2.1, Data Sciences Inc.) kontinuierlich gemessen. Hierzu wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemisches (80 mg/kg Ketamin + 16 mg/kg Xylazin) anästhesiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Kneifen in den Zwischenzehenbereich (Flexorreflex) wurden die Mäuse auf einer Wärmematte (Thermolux®, Witte und Suttor, Murrhardt, Deutschland), um die Beibehaltung der physiologischen Körpertemperatur während der Operation zu gewährleisten, in Bauchlage fixiert. Nach Vorbereitung des Operationsfeldes durch Rasur und Desinfektion der Haut wurde zunächst eine 2,5 cm lange Inzision am Rücken des Tieres in Schulterblattthöhe durchgeführt. Die Haut wurde von der Unterhaut vorsichtig gelöst und der Transmitter (Modell PA-C-10) wurde hier subkutan in einer Hauttasche fixiert. Der mit dem Transmitter verbundene Katheter wurde danach von der Inzision am Rücken subkutan über

den Nacken auf eine zuvor gesetzte Inzision an der Halsunterseite geschoben. An der Halsunterseite wurde anschließend die rechte Vena jugularis vorsichtig unter Schonung der Unterkieferspeicheldrüsen (*Glandula mandibularis*) isoliert und cranial ligiert. Nach vorsichtiger Eröffnung der Vena jugularis wurde der Katheter in die Vene eingeführt und bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Die richtige Position der Katheterspitze wurde anhand des übertragenen Signals der typischen Blutdruckwellen am PC kontrolliert (siehe Abb. 12). Schließlich wurde der Katheter sorgfältig fixiert.



**Abb. 12:** Schematische Illustration der Druckkurve bei unterschiedlichen Katheterplazierungen, die Katheterspitze muss sich zur genauen Messung des Blutdruckes im Blutstrom befinden.

Nach Verschluss der Haut durch Einzelhefte erholten sich die Mäuse 3 Tage in Einzelkäfigen. Währenddessen wurden sie über das Trinkwasser antibiotisch mit Enrofloxacin 2,5% (1ml/250ml Leitungswasser) versorgt. Keine der operierten Mäuse zeigte Anzeichen einer Entzündung oder Infektion.

Nach Abschluss der Rekonvaleszenz durchliefen die operierten Mäuse den Versuchsablauf wie in 4.2.1 geschildert. Es wurde über das beschriebene Radiotelemetriesystem die Herzfrequenz und der rechtsventrikuläre systolische Blutdruck über 35 Tage täglich morgens und abends jeweils 5 Minuten gemessen und aufgezeichnet. Die Daten wurden abgespeichert und konnten zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet werden.

Nach Abschluss der Versuche wurden die Transmitter unter vorheriger Narkose (wie oben beschrieben) entnommen und zur weiteren Verwendung vorsichtig gereinigt und über Nacht zur Desinfektion in 2 %ige Glutaraldehydlösung eingelegt. Die folgende Präparation der Mäuse sowie der weiteren Arbeitsschritte wurden, wie in den Kapiteln 4.2.5 bis 4.2.9 beschrieben, durchgeführt.

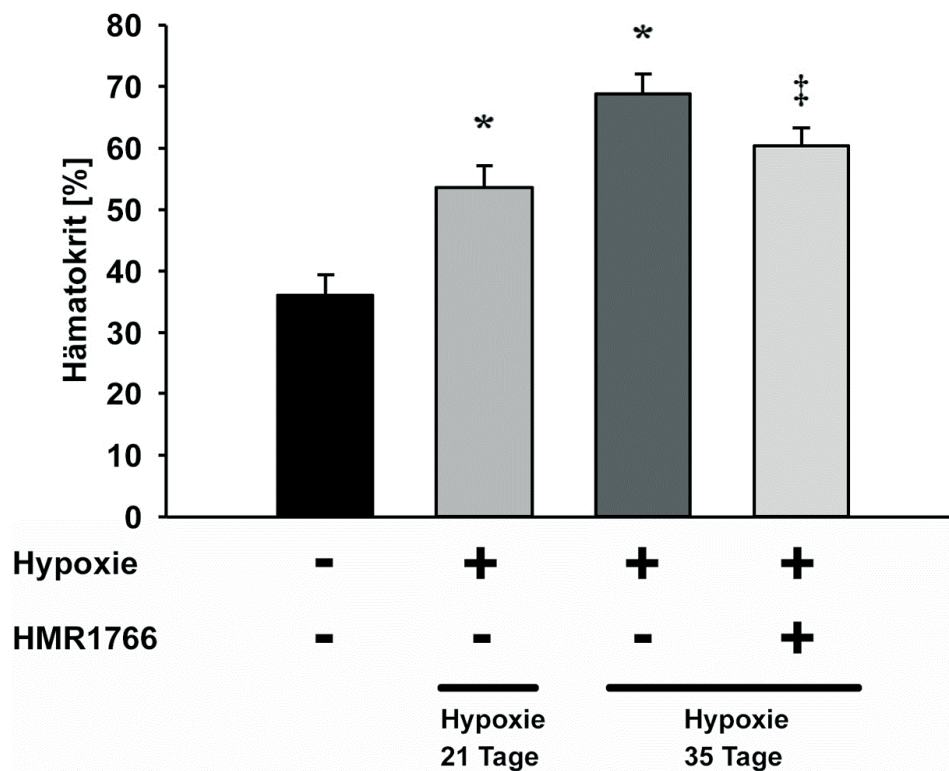
#### **4.2.13 Statistische Datenauswertung**

Die aufgeführten Daten sind als Mittelwerte (MW) mit ihrer Standardabweichung (SD) angegeben. Die n-Zahl der eingesetzten Tiergruppen entspricht, soweit nicht anders angegeben, den im Kapitel 4.2.1 angegebenen Tierzahlen. Die erhobenen Daten der normoxischen Kontrollgruppe zu den nicht mit HMR 1766 behandelten hypoxischen Tiergruppen sowie der nicht mit HMR 1766 behandelten hypoxischen Tiergruppen zu der Therapiegruppe wurden mit einer Varianzanalyse und anschließendem Student-Newman-Keuls-post-hoc-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Werte von mindestens  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant bewertet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Hämatokrit

Anhand von entnommenen Blutproben wurde der Hämatokritwert bei den Versuchstieren mit Hilfe der Hämatokritzentrifuge ermittelt. Je länger sich die Tiere unter Hypoxie befanden, desto höhere Hämatokritwerte wurden gemessen. Am Tag 35 war in der Hypoxiegruppe der Hämatokritwert mit knapp 70% fast doppelt so hoch ( $68,71 \pm 3,20\%$ ) wie in der normoxischen Kontrollgruppe ( $36,25 \pm 3,30\%$ ). Nach zweiwöchiger Gabe der Substanz HMR 1766 konnte ein geringerer Anstieg des Hämatokritwertes ( $60,37 \pm 3,02\%$ ) als in der unbehandelten Hypoxiegruppe ( $68,71 \pm 3,20\%$ ) beobachtet werden.



**Abb. 13:** Darstellung des Hämatokritwertes in den verschiedenen Tiergruppen mit jeweils n=7. Unter der Behandlung mit HMR 1766 kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe, die 21 Tage unter hypoxischen Bedingungen verblieb, zu einem geringeren Anstieg des Hämatokritwertes wie in der unbehandelten Kontrollgruppe, die 35 Tage unter Hypoxie gehalten wurde.

(\* p < 0.05 vs. Kontrollgruppe; ‡ p < 0.05 vs. 35 Tage Hypoxie)

## 5.2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

Es wurde der Effekt von HMR 1766 auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) an isoliert perfundierten und ventilierten Mauslungen untersucht. HMR 1766 verringerte in den hypoxischen Beatmungsphasen (1% Sauerstoff) und somit in der akuten Phase der HPV den pulmonalarteriellen Blutdruck (PAP) in Lungen von Mäusen, die 21 Tage unter Normoxie (21% Sauerstoff) gehalten wurden. Die stärkste Verringerung des pulmonalarteriellen Blutdruckes und damit der größte hemmende Effekt auf die HPV wurde bei der höchsten Konzentration an HMR 1766 von 10,0  $\mu\text{M}$  gemessen.

Auf die isolierten Lungen von Mäusen, die zuvor 21 Tage unter Hypoxie (10% Sauerstoff) gehalten wurden, zeigte HMR 1766 die gleiche Wirkung. Auch hier wurde festgestellt, dass HMR 1766 einen hemmenden Effekt auf die HPV hat. Bei der höchsten Konzentration von HMR 1766 (10  $\mu\text{M}$ ) wurde der PAP im Vergleich zur hypoxischen Kontrollgruppe um ca. 80% gesenkt (siehe Abb. 14). Zu bemerken ist, dass der hemmende Effekt gleicher Konzentrationen von HMR 1766 auf die HPV in den isolierten hypoxischen Mauslungen stärker war als in den isolierten normoxischen Mauslungen.

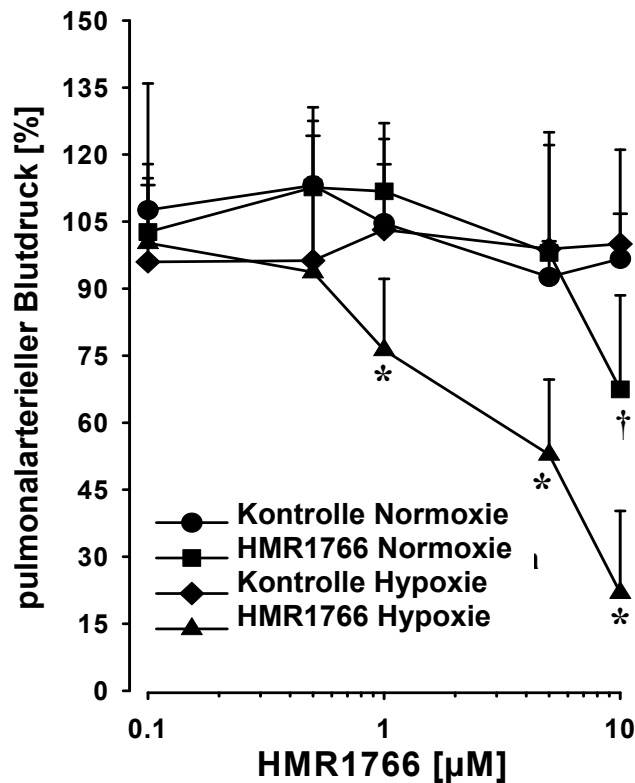


**Tab. 5:** Effekt von HMR 1766 auf die HPV an isoliert perfundierten und ventilierten Mäusen (mit jeweils n=6), die wie oben beschrieben untersucht wurden.

Konzentration HMR 1766 (µM)	Normoxie		Hypoxie	
	Kontrolle PAP (mm Hg)	HMR1766 PAP (mm Hg)	Kontrolle PAP (mm Hg)	HMR1766 PAP (mm Hg)
0,1	2,2±0,1	2,0±0,3	2,0±0,4	2,0±0,7
0,5	2,3±0,2	2,2±0,4	2,0±0,7	1,9±0,4
1,0	2,1±0,3	2,2±0,3	2,0±0,4	1,5±0,3
5,0	1,9±0,2	2,0±0,5	2,0±0,5	1,0±0,3
10,0	2,0±0,2	1,3±0,4	2,0±0,4	0,4±0,4

In Tab. 5 wird die hemmende Wirkung von HMR 1766 auf die HPV, ausgelöst durch die hypoxischen Beatmungsphasen, mit einer Verringerung des pulmonalarteriellen Blutdruckes (PAP) verdeutlicht.

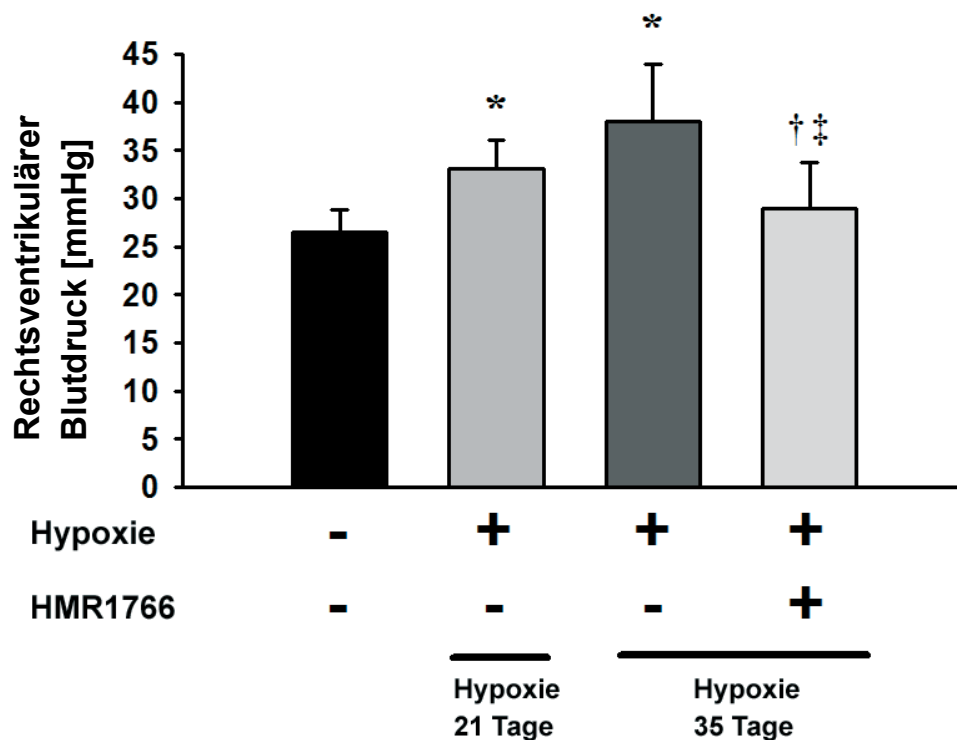
Die Ergebnisse aus Tab. 5 decken sich mit dem unten aufgeführten Diagramm, bei dem dieser hemmende Effekt von HMR 1766 auf die HPV prozentual dargestellt wird.



**Abb. 14:** Konzentrationsabhängige Wirkung der Substanz HMR 1766 auf die akute Phase der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) an isoliert perfundierten und ventilerten Mäusen (mit jeweils n=6). Normoxische (21% Sauerstoff) und hypoxische (1% Sauerstoff) Beatmungsphasen wechselten sich ab. Durch die 10 Minuten andauernden, sich wiederholenden hypoxischen Beatmungsphasen wurde die akute Phase der HPV ausgelöst. Die unterschiedlichen Konzentrationen von HMR 1766 wurden in einer aufsteigenden Dosisreihe von 0,1 bis 10,0 μM in der normoxischen Beatmungsphase den Lungen von Mäusen, die entweder unter normoxischen oder unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden, zugeführt. Die aufgezeichneten Ergebnisse jedes individuellen Versuches beziehen sich auf den Druckwert der **initialen HPV (= 100%)**. (\* p < 0.05 vs. Kontrollgruppe Hypoxie; † p < 0.05 vs. Kontrollgruppe Normoxie)

### **5.3 Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck**

Die Applikation von HMR 1766 wurde an Mäusen vorgenommen, die unter chronischer Hypoxie eine pulmonale arterielle Hypertonie entwickelten. Dabei wurde von Tag 21-35 eine tägliche subkutane Injektion von HMR 1766 (10 mg/kg Körpergewicht) durchgeführt. Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, senkte HMR 1766 nach der zweiwöchigen Behandlung signifikant den rechtsventrikulären (RVSP) Blutdruck bei anästhesierten Mäusen und betrug in der Therapiegruppe im Mittel  $29,0 \pm 2,3$  mmHg ( $p < 0.05$  vs. 21 Tage und 35 Tage Hypoxie). Der RSVP betrug bei den Mäusen, die 3 Wochen unter Hypoxie gehalten wurden,  $33,1 \pm 3,0$  mmHg und bei denjenigen, die 5 Wochen unter Hypoxie gehalten wurden,  $38,1 \pm 5,9$  mmHg. Bei den gesunden Kontrolltieren unter Normoxie betrug der Mittelwert des rechtsventrikulären Blutdruckes  $26,6 \pm 2,3$ .

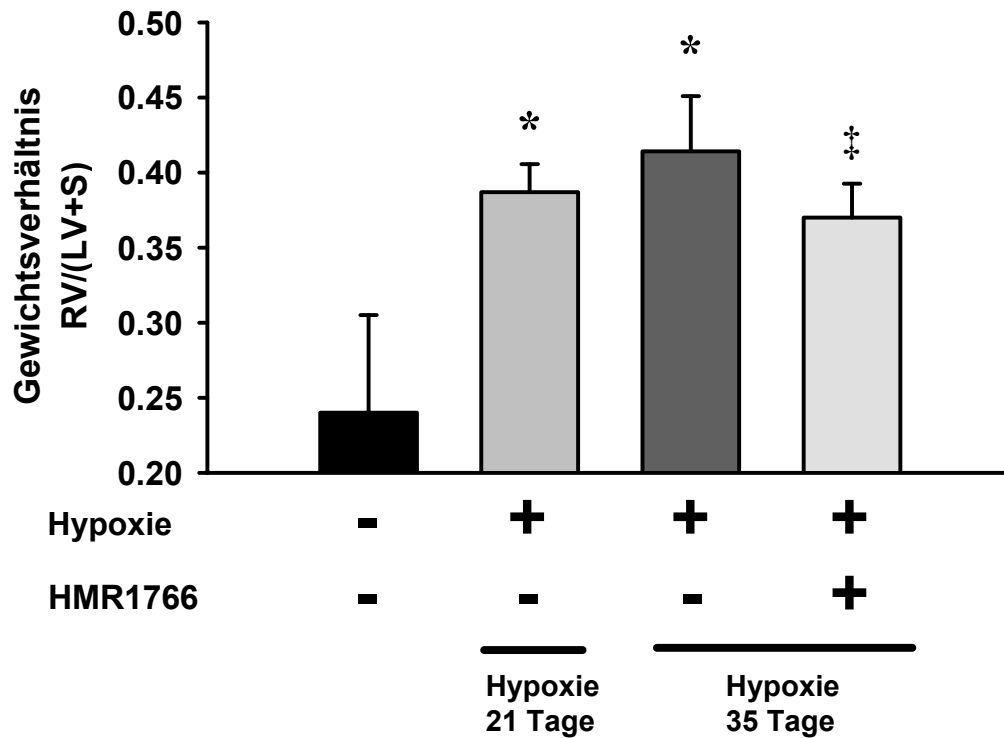


**Abb. 15:** Auswirkungen von HMR1766 auf den rechtsventrikulären Blutdruck in Mäusen mit einer pulmonalen Hypertonie. Die Versuchstiere mit jeweils n=10 wurden entweder für 21 oder für 35 Tage unter hypoxischen Bedingungen (10% Sauerstoff) gehalten. Die Kontrollgruppe (n=10) verblieb unter normoxischen Bedingungen (21% Sauerstoff). Die Therapie mit HMR 1766 wurde von Tag 21 bis Tag 35 an den weiter unter chronischer Hypoxie ausgesetzten Mäusen (n=8) durchgeführt. HMR 1766 wurde in einer Dosis von 10mg/kg Körpergewicht subkutan injiziert. In den Diagrammen ist der rechtsventrikuläre systolische Blutdruck in den verschiedenen Tiergruppen dargestellt.

(\*  $p < 0.05$  vs. Kontrollgruppe; †  $p < 0.05$  vs. 21 Tage Hypoxie; ‡  $p < 0.05$  vs. 35 Tage Hypoxie)

#### 5.4 Herzgewichtsverhältnisse (Heart Ratio)

Die C57Bl/6J-Mäuse entwickelten unter Hypoxie innerhalb 21 Tage eine pulmonale Hypertonie. Von Tag 21 bis 35 wurden die Mäuse weiter unter Hypoxie gehalten, um eine pulmonale Hypertonie aufrecht zu erhalten. Neben den hämodynamischen Veränderungen weisen auch die Herzgewichtsverhältnisse (Heart Ratio) im Laufe des o.g. Zeitraums Abweichungen auf. Aufgrund der erhöhten Druckbelastung des rechten Ventrikels unter chronischer Hypoxie tritt eine Rechtsherzhypertrophie auf. Zur Quantifizierung der Rechtsherzhypertrophie wurden die Herzgewichtsverhältnisse aus rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel einschließlich des Septums bestimmt. Bei den gesunden Kontrolltieren, die unter Normoxie gehalten wurden, betrug das Verhältnis  $0,24 \pm 0,07$ . Nach einer 21-tägigen Exposition der Mäuse unter Hypoxie stieg das Verhältnis auf  $0,39 \pm 0,02$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrollgruppe). Nach 35 Tagen unter chronischer Hypoxie war ein weiterer Anstieg auf  $0,41 \pm 0,04$  ( $p < 0.05$  vs. Kontrollgruppe) zu sehen. Die Therapiegruppe wurde von Tag 21 bis Tag 35 mit 10mg HMR 1766/kg Körpergewicht behandelt und zeigte eine signifikante Reduktion des Herzgewichtsverhältnisses auf  $0,37 \pm 0,03$  ( $p < 0.05$  vs. 35 Tage Hypoxie ohne Behandlung).



**Abb. 16:** Darstellung der Auswirkungen von HMR 1766 auf die Rechtsherzhypertrophie in Mäusen mit pulmonaler Hypertonie. Die Versuchstiere mit jeweils n=10 wurden entweder für 21 oder für 35 Tage unter hypoxischen Bedingungen (10% Sauerstoff) gehalten. Die Kontrollgruppe (n=10) verblieb unter normoxischen Bedingungen (21% Sauerstoff). Die Therapie mit HMR 1766 wurde von Tag 21 bis Tag 35 an den weiter der chronischen Hypoxie ausgesetzten Mäusen (n=8) durchgeführt. HMR 1766 wurde in einer Dosis von 10mg/kg Körpergewicht subkutan injiziert. Die Herzgewichtsverhältnisse aus dem rechten Ventrikel (RV) und dem linken Ventrikel einschließlich Septum (LV+S) zur Detektion der Rechtsherzhypertrophie wurden errechnet.

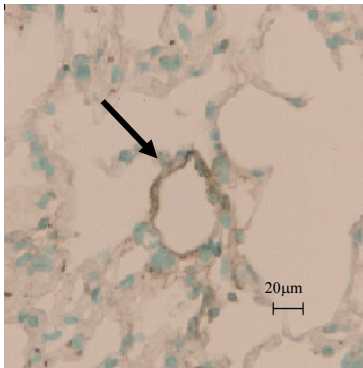
(\* p < 0.05 vs. Kontrollgruppe; ‡ p < 0.05 vs. 35 Tage Hypoxie)

## **5.5 Muskularisierungsgrad der Lungengefäße**

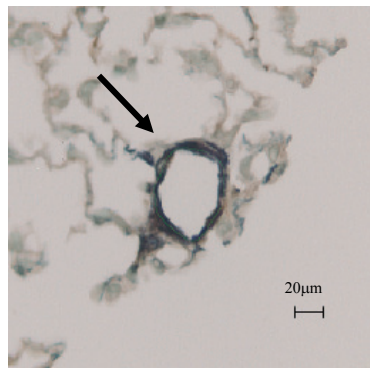
Durch Ausbildung einer Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie kommt es zu einer verstärkten Muskularisierung vor allem in den kleinen arteriellen Lungengefäßen. In den vorliegenden Abbildungen wird der positive therapeutische Effekt des Guanylatzyklase-aktivators HMR 1766 auf den Muskularisierungsgrad arterieller pulmonaler Gefäße bei Mäusen mit einer pulmonalen Hypertonie gezeigt. Um den Muskularisierungsgrad zu bestimmen, wurde die immunhistochemische Doppelfärbung, wie in 4.2.9 beschrieben, durchgeführt. In dieser Doppelfärbung gegen das alpha smooth muscle actin und gegen den von-Willebrand-Faktor stellt sich die Gefäßwand der glatten Muskelzellen violett, das Endothel braun dar. Somit konnte der Muskularisierungsgrad sichtbar gemacht werden und zur quantitativen Analyse herangezogen werden. Es wurde der Anteil der violett gefärbten Gefäßwand der glatten Muskelzellen bestimmt.

Der Verlauf der pulmonalen Hypertonie in den vorliegenden Experimenten konnte somit verdeutlicht werden. Je länger die Mäuse der Hypoxie ausgesetzt waren, desto stärker war die Muskularisierung in den arteriellen Pulmonalgefäßen. Unter der Therapie von HMR 1766 zeigte sich eine Abnahme des Muskularisierungsgrades.

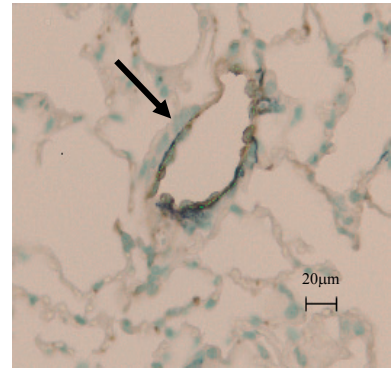
19a



19b



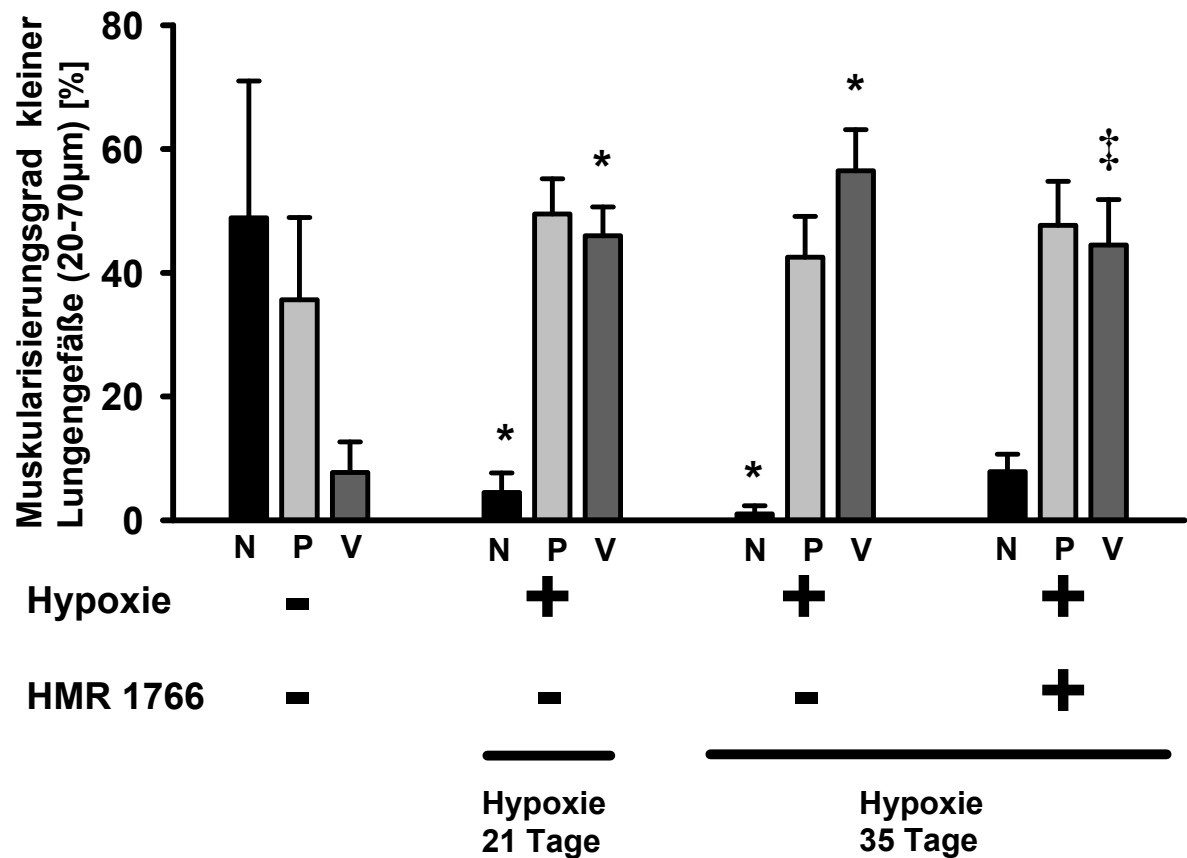
19c



**Abb. 17:** Nach immunhistochemischer Doppelfärbung wird die Gefäßwand der glatten Muskelzellen violett (gegen alpha-smooth-muscle-actin) und das Endothel braun (gegen von-Willebrand-Faktor) gefärbt. Zu sehen sind Pulmonalgefäße der verschiedenen Tiergruppen, die unter Normoxie (a, unverändertes, braun gefärbtes Endothel) und chronischer Hypoxie (b, durch Hyperplasie der Muskelzellen verdickte, dunkelviolet gefärbte Gefäßwand) gehalten wurden. In (c) sind Pulmonalgefäße von Mäusen zu sehen, die ebenfalls unter chronischer Hypoxie gehalten wurden, allerdings täglich von Tag 21 bis 35 mit einer Dosis von 10mg/kg Körpergewicht HMR 1766 per subkutaner Injektion behandelt wurden. Hier ist nur ein schmaler Saum von blau gefärbten Muskelzellen zu erkennen. Die Pulmonalgefäße sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.



Computergestützt wurden 80 intraacinar Lungengefäße in der Gefäßkategorie zwischen 20-70µm Außendurchmesser bei einer 400 fachen Vergrößerung mit dem von Leica speziell für diese Auswertung entwickeltem Programm morphometrisch analysiert. Es wurde der violette Anteil der anti-alpha smooth muscle actin-Färbung in der Gefäßwand bestimmt und in voll, teil- und nicht muskularisierte Kategorien eingeteilt (siehe Seite 43). In der gesunden normoxischen Kontrollgruppe besteht in der Gefäßkategorie zwischen 20-70µm der größte Teil aus nicht und voll muskularisierten Gefäßen (siehe Abb. 18). In den Tiergruppen, die 21 oder 35 Tagen unter chronischer Hypoxie gehalten wurden, konnte eine starke Reduktion der nicht muskularisierten arteriellen Lungengefäße gekoppelt mit einer Zunahme an partiell und voll muskularisierten arteriellen Lungengefäßen detektiert werden. Mit Progression der pulmonalen Hypertonie wurden nicht muskularisierte Gefäße zunehmend in teil- und voll muskularisierte Gefäße umgewandelt. Nach 5 Wochen Hypoxie wurden nur noch wenige nicht muskularisierte Pulmonalgefäße erfasst. Die Applikation des Guanylatzyklaseaktivators HMR1766 vom 21. - 35. Tag zeigte eine signifikanten Reduktion des Anteils der voll muskularisierten zugunsten der teil muskularisierten Lungenarterien ( $p < 0.05$  vs. 35 Tage Hypoxie). Dadurch stieg der Anteil der teil muskularisierten Lungenarterien leicht an. Es konnte sogar wieder ein Anteil nicht muskularisierter pulmonaler Lungengefäße analysiert werden.



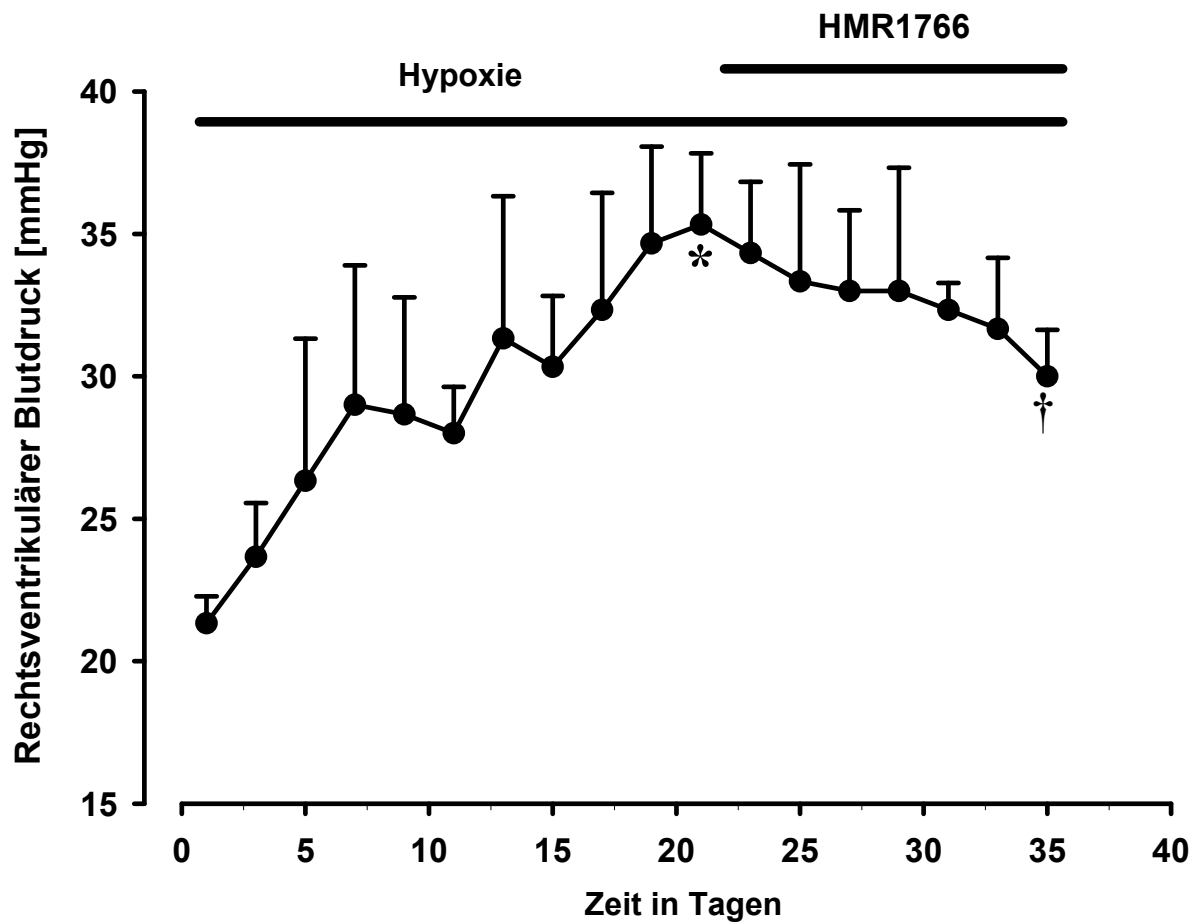
**Abb. 18:** Darstellung der Auswirkungen von HMR 1766 auf den Muskularisierungsgrad in Lungengefäßen von Mäusen mit pulmonaler Hypertonie. Die Versuchstiere wurden entweder für 21 oder für 35 Tage unter hypoxischen Bedingungen (10% Sauerstoff) gehalten. Die Kontrollgruppe verblieb unter normoxischen Bedingungen (21% Sauerstoff). Die Therapie mit HMR 1766 wurde von Tag 21 bis Tag 35 an den weiter unter chronischer Hypoxie ausgesetzten Mäusen durchgeführt. HMR 1766 wurde in einer Dosis von 10mg/kg Körpergewicht subkutan injiziert. Es ist der prozentuale Anteil von nicht (N), partiell (P) und voll (V) muskularisierten Gefäßen in den verschiedenen Tiergruppen mit jeweils n=10 aufgeführt. Es wurden in jeder Mauslunge 80 kleine arterielle Lungengefäße mit einem Durchmesser zwischen 20-70 µm erfasst und analysiert.

(\* p < 0.05 vs. Kontrollgruppe; ‡ p < 0.05 vs. 35 Tage Hypoxie)

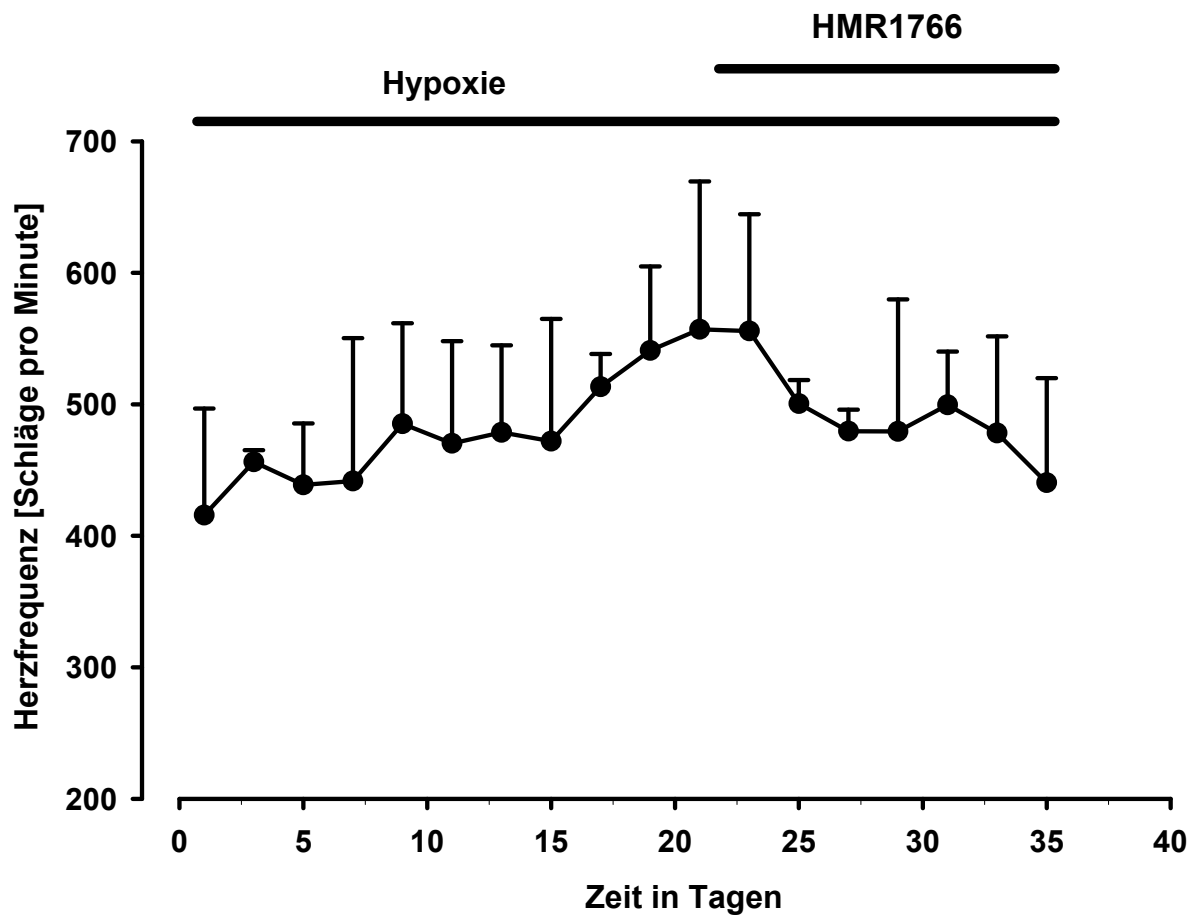
## 5.6 Telemetrie

Die telemetrischen Messungen des rechtsventrikulären systolischen Blutdruckes (RVSP) und der Herzschläge pro Minute wurden an wachen und frei beweglichen Mäusen durchgeführt. Durch das in 4.2.12 beschriebene Radiotelemetriesystem konnte die Herzfrequenz und der rechtsventrikuläre systolische Blutdruck über 35 Tage täglich morgens und abends jeweils 5 Minuten gemessen und aufgezeichnet werden. Die Versuchstiere wurden 21 Tage unter hypoxischen Bedingungen gehalten und entwickelten in dieser Zeit eine pulmonale Hypertonie. Die Therapie mit HMR 1766 wurde von Tag 21 bis Tag 35 an den weiter unter chronischer Hypoxie ausgesetzten Mäusen durchgeführt.

Die durch Telemetrie erhaltenen Daten zeigten, dass es zunächst durch Progression der pulmonalen Hypertonie unter Hypoxie zu einem Anstieg des RVSP über 21 Tage kam. Eine tägliche subkutane Injektion von 10 mg/kg Körpergewicht HMR 1766 reduzierte den RVSP bis zum Tag 35 um ca. 10 % (vgl. Abb. 19a). Die Herzfrequenz stieg bis zum Tag 21 von 420 auf 550 Herzschläge pro Minute. Unter der Behandlung mit HMR 1766 sank die Herzfrequenz bis zum Tag 35 wieder auf Werte um 420 Herzschläge pro Minute (vgl. Abb. 19b).



**Abb. 19a:** Telemetrische Messung des rechtsventrikulären Blutdruckes in wachen, frei beweglichen und 35 Tage unter Hypoxie gehaltenen Mäusen, die ab dem 21.Tag mit der Substanz HMR 1766 behandelt wurden (n=5).  
 (\*  $p < 0.05$  vs. Tag 1; †  $p < 0.05$  vs. Tag 21)

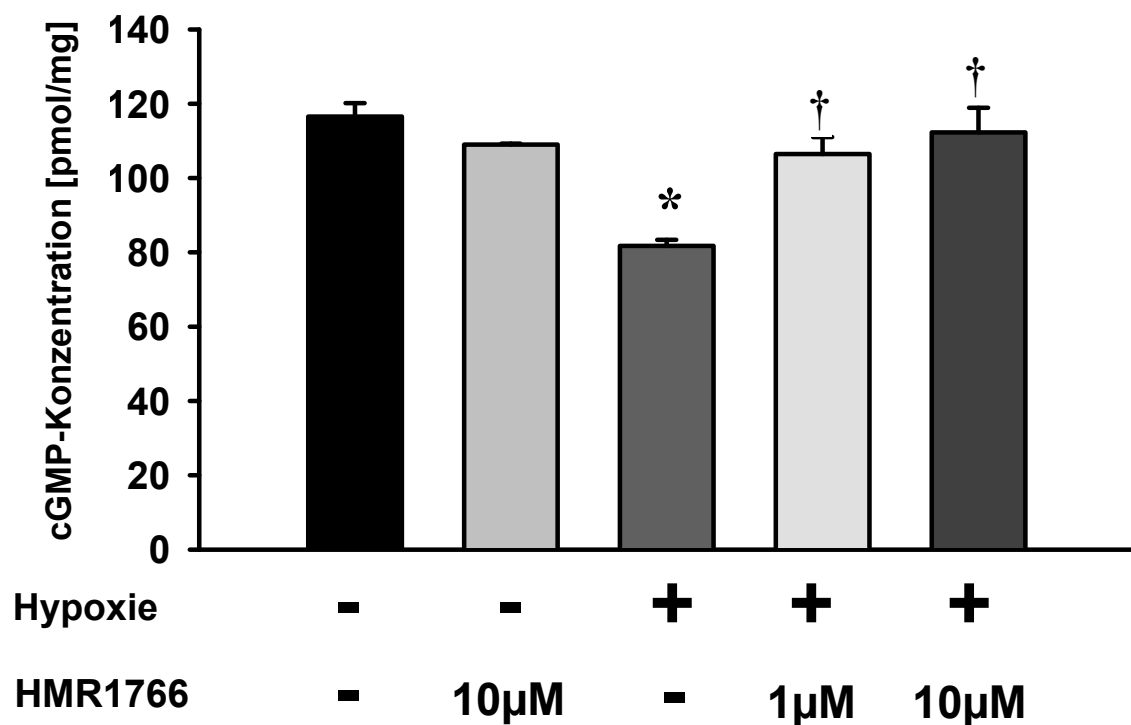


**Abb. 19b:** Telemetrische Messung der Herzschläge in wachen, frei beweglichen und 35 Tage unter Hypoxie gehaltenen Mäusen, die ab dem 21.Tag mit der Substanz HMR 1766 behandelt wurden (n=5).

## 5.7 cGMP-Konzentration

Der cGMP-Spiegel isolierter glatter Muskelzellen aus Lungenarterien von Mäusen wurde ermittelt. Die Tiere wurden zunächst in verschiedenen Gruppen gehalten und 21 Tage einem Sauerstoffgehalt von 10% ausgesetzt oder verblieben durchgehend unter normoxischen Verhältnissen. Isolierte glatte Muskelzellen aus den Pulmonalarterien dieser Gruppen wurde mit dem sGC-Aktivator HMR 1766 (1 oder 10 $\mu$ M) für 24 Stunden behandelt. Die normoxische und hypoxische Kontrollgruppe wurden nicht mit HMR 1766 behandelt.

In Abb. 20 wird deutlich, dass unter chronischer Hypoxie die Konzentration an cGMP in isolierten glatten Muskelzellen im Vergleich mit der normoxischen Kontrollgruppe sank. Unter der Behandlung mit HMR 1766 über 24 Stunden wurde die cGMP-Konzentration in den glatten Muskelzellen pulmonaler Arterien, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren, erhöht.



**Abb. 20:** Ermittlung der cGMP-Konzentration isolierter glatter Muskelzellen aus den Lungenarterien verschiedener Tiergruppen (mit jeweils n=4). Gemessen wurde der cGMP-Spiegel in pmol/mg Protein (\* p < 0.05 vs. Normoxie; † p < 0.05 vs. 21 Tage Hypoxie)

## **6 Diskussion**

### **6.1 Das Tiermodell**

In der pneumologischen Forschung gibt es verschiedene Tiermodelle, die den klinischen Verlauf und die pathophysiologischen Veränderungen der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie (IPAH) des Menschen imitieren. Ziel translationaler Forschungsansätze ist es, neue Therapiekonzepte zur Behandlung der IPAH zu entwickeln.

Am häufigsten werden zwei Tiermodelle zur Untersuchung einer pulmonalen Hypertonie (PH) herangezogen. Die durch Monocrotalin (MCT) induzierte PH wird durch einen toxischen Stimulus ausgelöst und vorwiegend an Ratten angewandt. Für das Tiermodell der Hypoxie-induzierten PH werden meist Mäuse verwendet. Die PH entsteht sekundär als Folge der chronischen Hypoxie, wie es auch bei der Hypoxie-induzierten PH des Menschen der Fall ist (Voelkel und Tudor, 1995). Beim MCT-Modell führt die subkutane Applikation des Toxins zu Endothelschäden mit nachfolgender Permeabilitätserhöhung und zu einer Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskelzellen der Lungengefäße (Wilson et al., 1989; Tanaka et al., 1996). Vier Wochen nach der Injektion von MCT kommt es zum Gefäßumbau in den Pulmonalarterien sowie zu einem starken Anstieg des rechtshertikulären systolischen Blutdruckes (Campbell et al., 2001). Ca. sechs Wochen nach der Injektion hat sich eine schwere PH entwickelt, die mit den Stadien 3 und 4 NYHA-Klassifikation (siehe auch Tab. 2, Seite 13) vergleichbar ist, so dass die Ratten schließlich am Rechtsherzversagen versterben (Yuan et al., 2011). Chronische Hypoxie verursacht eine sanfte Form der PH, welche mit dem Stadium 2 der NYHA-Klassifikation zu vergleichen ist (Yuan et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der Hypoxie-induzierten PH in der Maus verwendet. Schon in früheren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass durch chronische Hypoxie eine PH ausgebildet wird (z.B. Urbanova et al., 1973; Rabinovitch et al., 1979; Weissmann et al., 2003; Dumitrascu et al., 2006).

In den vorliegenden Experimenten wurden Mäuse über einen längeren Zeitraum unter chronischer Hypoxie gehalten, bei der die Sauerstoffkonzentration bei normobarem Luftdruck nur 10 % betrug (normobare Hypoxie). Dies führt zu einer Erhöhung des

pulmonalarteriellen Blutdruckes um 40-50 %. Rechtsherzhypertrophie und ein Gefäßumbau (Remodeling) der kleinen Pulmonalarterien sind die Folge. Nicht muskularisierte Gefäße zeigen eine sogenannte „*de-novo*-Muskularisierung“ und werden zu partiell muskularisierten Gefäßen umgebaut (Rabinovitch et al., 1979).

Eine PH des Menschen kann verschiedene Ursachen haben. Ausgelöst wird sie z. B. durch Erkrankungen wie obstruktive Lungenerkrankungen, Pneumonien, Asthma bronchiale, sowie alle weiteren Erkrankungen, die zu einer alveolären Hypoventilation führen. Bei allen Patienten zeigen sich strukturelle Veränderungen an den Pulmonalarterien (van Suylen et al., 1998).

Auch Menschen, die in großer Höhe wohnen, entwickeln eine pulmonale Hypertonie. Das Verhältnis der Gase der Luft bleibt zwar auch in großen Höhen gleich und beträgt bei Sauerstoff weiterhin 21%, doch der Luftdruck und damit der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) nimmt ab. In einer Höhe von 4000 Metern fällt der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) von 760mmHg (Meeresspiegel) auf ca 450 mmHg ab. Der Anteil an Sauerstoff nimmt somit von 21% in Meeresspiegelhöhe auf ca 13% ab. Einen Sauerstoffanteil von 10% ist in einer Höhe von ca. 5800 Metern zu erwarten.

Histologische Untersuchungen von Pulmonalgefäßen aus Patienten, die in Hochgebirgen leben, zeigen den charakteristischen Gefäßumbau, wie es bei einer Hypoxie-induzierten PH zu sehen ist (Arias-Stella und Saldana 1963; Gamboa und Marticorena 1972).

Mit dem vorliegenden Tiermodell wird nicht nur der klinische Verlauf einer Hypoxie-induzierten PH des Menschen widerspiegelt, sondern auch die bei einer PH des Menschen auftretenden pathognomonischen Gefäßveränderungen reflektiert.

Auch bei allen anderen Säugetieren bildet sich durch Hypoxie eine PH aus. Sie zeigen alle die gleichen Umbauprozesse in den arteriellen Pulmonalgefäßen. Das Ausmaß der Gefäßveränderungen allerdings kann sich unterscheiden. Zu berücksichtigen sind Spezies, Geschlecht und der Entwicklungsstand des Tieres (Weissmann et al., 2006). Interessanterweise gibt es einige Ausnahmen bei an große Höhen angepassten Säugetieren. Untersuchungen haben ergeben, dass das Yak, das Lama, der Pfeifhase und das tibetische Schneeschwein keine strukturellen Gefäßveränderungen in der Lunge zeigen (Durmowicz et al., 1993; Rhodes, 2005). Kreuzungen von Yaks mit nicht an große Höhen angepassten Rindern zeigten einen autosomal-dominanten Vererbungsgang (Anand et al., 1986), eine



wichtige Erkenntnis für weitere genetische Untersuchungen in der Forschung über Ausbildung und Therapie der PH.

Bemerkenswert ist, dass sich die Bewohner der Anden und Tibets über Jahrtausende an den Lebensraum in großen Höhen angepasst haben. Sie zeigen keine klinischen Symptome einer durch einen geringen Sauerstoffanteil ausgelösten PH (Moore, 2001; Tucker und Rhodes, 2001).

Eine optimale und kontinuierliche Haltung unter 10 % Sauerstoff über 21 Tage in dafür vorgesehenen Kammern bei den vorliegenden Tierexperimenten war unbedingt einzuhalten, um eine vollständige Ausbildung der PH zu gewährleisten. Die Kammern wurden hierzu fortlaufend über Sensoren kontrolliert. Nur einmal pro Tag wurden sie zur Säuberung sowie Futter- und Wasserbereitstellung kurz geöffnet.

Diese Veränderungen in der Hämodynamik nach Ausbildung einer PH können nicht aufrecht gehalten werden, wenn der Organismus sich für mindestens zehn Tage wieder unter normoxischen Bedingungen aufhält. Sie reduzieren sich und erreichen wieder Normalwerte (Ressl et al., 1974). Allerdings gehen die histomorphologische Veränderungen in der Gefäßmuskulatur langsamer zurück (Meyrick und Reid, 1980; Fried und Reid, 1984). 2014 konnte in Versuchen bei Mäusen gezeigt werden, dass der durch chronische Hypoxie ausgelöste strukturelle Gefäßumbau sich nach 3 wöchiger Reoxygenierung wieder vollständig normalisierte (Weisel et al., 2014).

Wichtig für den Therapiebeginn mit HMR 1766 war die vollständige Ausbildung der PH bei den Versuchstieren. Diese wurde nach 21 Tagen kontinuierlicher Haltung unter 10 % Sauerstoff erreicht und war also der richtige Zeitpunkt, um mit der Applikation von HMR 1766 zu beginnen. Zu diesem Zeitpunkt liegen sowohl bereits histomorphologische Veränderungen in den Pulmonalgefäßen, als auch eine Hypertrophie des rechten Ventrikels vor.

Ein durch die PH verändertes klinisches Bild konnte bei den untersuchten Mäusen nicht beobachtet werden, eine Einteilung der Mäuse nach der NYHA-Klassifikation war nicht möglich. Im Verlauf der gesamten Exposition unter Hypoxie zeigten die Tiere keine klinischen Anzeichen eines gestörten Allgemeinbefindens.

Die Bestimmung der Gewichtsentwicklung bei Mäusen unter Hypoxie war Gegenstand der Doktorarbeit von der Tierärztin Dr. Christina Klöpping. Sie konnte in ihren Versuchen zeigen, dass unter chronischer Hypoxie eine Gewichtsreduktion bei den Mäusen verlief,

welche auf den Stress der Umstellung von Normoxie auf Hypoxie und mit Adaptionsmechanismen, wie der Höhendiurese, zurückzuführen waren.

In den Pathomechanismen einer Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie im Mausmodell und einer IPAH beim Menschen lassen sich Gemeinsamkeiten finden. Die Wachstumsfaktoren Platelet-derived-growth-factor und Vaskular-endothelium-growth-factor sowie verschiedene Entzündungsmediatoren werden bei der PH der Maus sowie bei der IPAH des Menschen als Reaktion auf die vaskuläre Belastung exprimiert und beeinflussen somit maßgeblich die vaskuläre Struktur und Funktion der Lungengefäße (Humbert et al. 1998; Budhiraja et al. 2004; Stenmark et al. 2006). 2008 identifizierte Kwapiszewska et al. das Protein Fhl-1 (Four and a half domains protein 1) bei verschiedenen Formen der PH. Eine Hochregulation dieses Proteins, das für die Entstehung einer PH eine wichtige Rolle spielt, konnte sowohl im Mausmodell als auch bei Personen mit einer IPAH bestätigt werden (Kwapiszewska et al. 2008).

Das Mausmodell demonstriert den Verlauf einer Hypoxie-induzierten PH. Die Erforschung der Signaltransduktionswege, die für die Entstehung einer PH verantwortlich sind, stellt einen wichtigen Schritt für Therapieoptionen dar. In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe des sGC-Aktivators HMR 1766 eine therapeutische Möglichkeit gezeigt, einen strukturellen Gefäßumbau in Folge einer PH wieder rückgängig zu machen. Die Folge ist die Reduktion des pulmonalen Blutdruckes auf nahezu Normwerte (siehe Abb. 15, Seite 58). Durch die Untersuchung dieser Mechanismen, die für die Umkehrung des Gefäßumbaus verantwortlich sind, könnten Medikamente entwickelt werden, die eine lebensbedrohliche PH nicht nur symptomatisch, sondern auch kausal therapieren könnten.

## **6.2 Die Regulation der sGC-Aktivität**

1980 zeigten Furchgott und Zawadzki, dass eine durch Acetylcholin vermittelte Relaxation der Blutgefäße endothelabhängig ist. Verantwortlich für diese gefäßrelaxierende Wirkung war die Existenz des endothelial derived relaxing factor (EDRF) (Furchgott und Zawadzki, 1980). Erst 1987 konnte EDRF als der Botenstoff NO identifiziert werden, der seitdem für die Therapie der PH eine wichtige Rolle spielt. In Forschungsprojekten konnte gezeigt werden, dass NO in der Lunge protektive Eigenschaften besitzt, wie z.B. eine

Vasodilatation, die Verbesserung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses und die Reduktion des pulmonalarteriellen Blutdruckanstieges und des Shunt-Flusses nach Ischämie und Reperfusion (Hermle et al., 1999).

2004 zeigten Ghofrani et al., dass NO die Lungendurchblutung in Abhängigkeit von der Ventilation reguliert, um ein optimales Ventilations-Perfusions-Verhältnis zu erzielen. Es kommt zu einer Umverteilung des Blutstromes zu den belüfteten und mit NO angereicherten Lungenbereichen. Diese Vasodilatation nur in den belüfteten Lungenarealen wird auch als selektive intrapulmonale Vasodilatation bezeichnet. Bei der inhalativen Verabreichungsform von NO können die protektiven Effekte auf den Lungenkreislauf beobachtet werden, jedoch zeigen die Patienten unterschiedliche körperliche Antworten auf inhaliertes NO. Bei einigen Patienten mit einer PH bleibt der positive Effekt von NO aus und es zeigt sich keine Verbesserung ihrer Lebenserwartung (Max und Rossaint, 1999). Eine Behandlung mit NO hat allerdings aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit und des Reboundeffektes nur eine begrenzte Effizienz (Ichinose et al., 2004).

Zunächst blieb die Aktivierung der sGC durch NO eine wichtige Eigenschaft in der Therapie der PH. Jedoch erkannte man, dass bei einer PH der NO-cGMP-Signaltransduktionsweg gestört ist, da es zu einer unzureichenden Aktivierung der sGC durch NO kommt. Um die Ursache zu ermitteln, wurden viele Experimente durchgeführt. 1995 zeigten Giaid et al., dass in den Muskelzellen der Lungengefäße bei Patienten mit einer PH weniger eNOS exprimiert wird. Somit sinkt die Konzentration an NO in den Muskelzellen. Eine verminderte NO-Synthese als Grund für eine unzureichende Aktivierung der sGC ist möglich. In anderen Experimenten wurde in den Lungen an pulmonalarterieller Hypertonie erkrankter Menschen eine verstärkte Expression des endogenen NOS-Inhibitors ADMA nachgewiesen (Pulamsetti et al., 2005).

1996 stellte Le Cras et al. fest, dass unter Hypoxie-Bedingungen in einigen Spezies die NO-Produktion vermindert wird, obwohl es in der Lunge zu einem Anstieg von NOS kommt. In weiteren Versuchen mit Ratten und Mäusen wurde gezeigt, dass unter Hypoxie vermehrt sGC exprimiert wird. Li D et al. konnte 1999 in Versuchen verdeutlichen, dass in den glatten Muskelzellen der pulmonalen Arterien einer durch Hypoxie veränderten Rattenlunge eine deutliche Erhöhung der  $\alpha 1$ -Untereinheit der sGC vorliegt. Des weiteren zeigte Li et al. 2001 anhand von Experimenten bei Mäusen, dass unter Hypoxiebedingungen die Konzentration der  $\alpha 1$ - und  $\beta 1$ -Untereinheit der sGC ansteigt. Aber sollte

sich mit einer gesteigerten Expression des sGC-Proteinlevels nicht die sGC-Aktivität erhöhen? Die Annahme, unter Hypoxie verändere sich durch eine chemische Reaktion die Struktur der sGC so, dass sie durch NO nicht mehr zu aktivieren sei, wurde in den folgenden Jahren weiter untersucht.

Neben den protektiven Eigenschaften von NO sind auch die toxischen Effekte des NO zu erwähnen. Lungen an PAH erkrankter Patienten befinden sich unter oxidativem Stress (Bowers et al., 2004). Darunter versteht man die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species). Zu diesen reaktiven Spezies gehören freie Radikale wie z.B. das Superoxidanion, die Perhydroxylradikale, das Hydroxylradikal sowie Wasserstoffperoxid, welches aus zwei Superoxidmolekülen durch die Superoxiddismutase (SOD) entsteht. Zusammen mit den Superoxidradikalen und den Hydrogenperoxiden reagiert NO zu toxischen Substanzen wie Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oder Hydroxylradikalen ( $\cdot\text{OH}$ ). Sie können das Alveolarepithel schädigen und die Surfactantfunktion in der Lunge beeinträchtigen (Fukuto, 1995). Eine erhöhte Produktion von ROS wird in Verbindung mit der Pathogenese vieler Herz-Kreislauf-Erkrankungen gebracht (Cai und Harrison, 2000).

Doch wie verhält sich ROS bei der Ausbildung einer PH? Ob die Konzentration von ROS bei einem Zustand chronischer Hypoxie in ihrer Konzentration ansteigt oder abnimmt, wurde in der Vergangenheit in verschiedenen Publikationen kontrovers diskutiert (Waypa et al., 2002; Goyal et al., 2004; Paddenberget al., 2003; Weir et al., 2005; Wu et al., 2007; Fuchs et al., 2010). Bei einem Anstieg der ROS-Produktion unter oxidativem Stress sind freie Radikale vorhanden, die das Häm der sGC oxidieren und somit maßgeblich in die Regulation der sGC eingreifen können. Eine erhöhte Konzentration von Superoxidradikalen dämpft durch Oxidation des Häms die Wirkung von NO auf die sGC (Cai und Harrison, 2000), d.h., dass die NO-sensitive Form der sGC in die NO-insensitive Form übergeführt wird. Daraus ergibt sich eine unzureichende Aktivierbarkeit der sGC durch NO.

Je nachdem, ob Substanzen auch noch nach Oxidation der prosthetischen Häm-Gruppe die sGC aktivieren können oder nicht, werden sie in Häm-abhängige Stimulatoren (wie z.B. YC-1, BAY 41-2272, BAY 41-8543, BAY 63-2521) und in Häm-unabhängige Aktivatoren

der sGC (BAY 58-2667 und HMR 1766) unterteilt (Stasch et al., 2001, 2002a, 2002b, 2002 c; Straub et al., 2002; Schmidt et al., 2004; Schermuly et al., 2008).

Die Substanzen der ersten Gruppe imitieren die Wirkung von NO auf die sGC und verlieren ihre Wirkung, sobald das Häm in oxidiert Form vorliegt oder entfernt wurde. BAY 58-2667 und HMR 1766 hingegen benötigen weder NO noch Häm, um die sGC zu aktivieren (Evgenov et al., 2006).

Nicht nur freie Radikale, sondern auch Substanzen, wie z.B. der sGC-Inhibitor ODQ, können die prosthetische Häm-Gruppe der sGC oxidieren (Dierks und Burstyn, 1998). Durch Experimente mit ODQ konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der sGC durch Häm-abhängige Stimulatoren nach der Oxidation der sGC durch ODQ blockiert wird (Stasch et al., 2006), ein guter Ansatz, die oxidierte Form der sGC weiter zu erforschen.

Es ist also wahrscheinlich, dass die Konzentration der oxidierten Form der sGC unter einigen pathologischen Bedingungen ansteigt, die einen oxidativen Stress auslösen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus (Hink et al., 2003), Arteriosklerose (Cai und Harrison, 2000) oder durch chronische Hypoxie ausgelöste Lungenerkrankungen. Die Forschung konzentrierte sich auf die oxidierte Form der sGC und ob diese durch andere Substanzen zu aktivieren sei. Mit BAY 58-2667 ist eine der ersten Substanzen gefunden worden, die die sGC NO- und Häm-unabhängig aktivieren kann. Einige Publikationen zu BAY 58-2667 wurden veröffentlicht (Evgenov et al., 2004; Stasch et al., 2002; Stasch et al., 2006).

Neben BAY 58-2667 wurde mit HMR 1766 ein weiterer NO- und Häm-unabhängiger Aktivator der sGC entdeckt. In Experimenten an sGC wurde erkannt, dass HMR 1766 bevorzugt die oxidierte sGC aktiviert (Schindler et al., 2006). Doch ist die Oxidation des Häms relevant für HMR 1766, um die sGC zu aktivieren? Oder kann HMR 1766 auch eine Häm-freie sGC aktivieren? Dieser Frage ist Zhou et al. 2008 nachgegangen und konnte in seinen Versuchen beweisen, dass, im Gegensatz zu Häm-abhängigen NO-Donatoren, HMR 1766 auf die Häm-freien sGC-Mutanten H105F und H105C anspricht. Interessanterweise war eine effektivere Aktivierung durch HMR 1766 an diesen sGC-Mutanten zu sehen als an der oxidierten Wildtypform der sGC (Zhou et al., 2008). Auch BAY 58-2667 ist in der Lage, die sGC Mutante H105F zu aktivieren (Schmidt et al., 2004). Diese Erkenntnis

unterstreicht die völlig andere Wirkungsweise der Häm-unabhängigen sGC Aktivatoren wie HMR 1766 und BAY 58-2667 im Gegensatz zu NO-Donatoren.

Mit HMR 1766 konnte die Hypothese der Existenz einer oxidierten Form der sGC verifiziert werden. (Schindler et al., 2006; Schindler et al., 2003). Schindler et al. zeigten, dass unter der Behandlung mit HMR 1766 die Konzentration von cGMP in VSMC (Vascular smooth muscle cells = glatte Gefäßmuskelzellen) ansteigt.

Auch mit den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte diese Hypothese untermauert werden. Dies verdeutlichen die Ergebnisse in 5.7: Es wurden die cGMP-Konzentrationen in glatten Muskelzellen der Lungengefäße von Mäusen bestimmt, die entweder unter normoxischen oder unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden. Zum einen sank unter chronischer Hypoxie die Konzentration an cGMP im Vergleich zu den normoxischen Kontrollgruppen, zum anderen erhöhte sich unter der Behandlung mit HMR 1766 die cGMP-Konzentration in der hypoxischen Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Dies ist im Einklang mit der Hypothese, dass die ROS-Produktion steigt und somit auch die Oxidation des Häms der sGC zunimmt. Die oxidierte sGC kann durch NO nicht mehr stimuliert werden, und die sGC kann nicht mehr die katalytische Umwandlung von GTP zu cGMP regulieren. Wenn HMR 1766 nicht nur ein NO-, sondern auch ein Häm-unabhängiger Aktivator der sGC ist und somit die oxidierte, inaktive Form der sGC aktivieren kann, wird eindeutig klar, dass die Konzentration an cGMP unter der Therapie mit HMR 1766 in den glatten Muskelzellen hypoxischer Lungengefäße weitaus höher sein musste als die der unbehandelten hypoxischen Kontrollen. Somit geben diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Hinweis auf die Anwesenheit der oxidierten Form der sGC, da in den isolierten glatten Muskelzellen eine endogene NO-Bildung vernachlässigt werden kann.

Inwieweit eine Oxidation des Häms durch ROS ausschlaggebend für die Aktivität der sGC ist, wurde schon früher diskutiert. Wingerter konnte 2005 in seinen Versuchen zeigen, dass Superoxid ( $O_2^-$ ) an der Oxidation des Häm-Eisens beteiligt sein musste. Er begründete dies in einer Aktivitätshemmung der sGC durch  $O_2^-$ . Um diese Hypothese zu beweisen, wurde zum einen das Häm entfernt, zum anderen dieses oxidiert. Beide sGC-Formen waren inaktiv und für NO insensitiv. Nach Aktivierung der Häm-freien sGC durch Protoporphyrin IX und der Häm-oxidierten sGC durch HMR 3448 wurden diese anschließend durch die Xanthinoxidase weitaus weniger potent gehemmt als die reduzierte,

Häm-haltige und durch NO aktivierte sGC. Dieses Ergebnis ließ also vermuten, dass eine erhöhte Konzentration an  $O_2^-$  die Aktivität der sGC dämpft.

$O_2^-$  reagiert mit NO zur Peroxynitrit, welches das Häm oxidiert und somit zu einer Inaktivität der sGC führt. Wingerter stellte fest, dass einerseits  $O_2^-$  die sGC durch Abfangen von NO in VSMC der Rattenaorta hemmte, aber andererseits sich die Aktivität der sGC durch Abfangen von  $O_2^-$ , z.B. durch SOD, erhöhte.

Die Auswirkungen von ROS auf Häm-unabhängige Aktivatoren der sGC scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. Beispielsweise verstärkt Peroxynitrit die Wirkung von Bay 58-2667 (Stasch et al., 2006). 2008 ergänzte Zhou et al. die Erkenntnis der positiven Wirkung von ROS auf die Aktivierung der oxidierten Form der sGC durch HMR 1766. Nicht nur von außen zugeführtes, auch das endogen entstandene ROS erhöhte die Effizienz von HMR 1766 auf die sGC und damit auf die Bildung höherer cGMP-Konzentrationen.

Können auch andere Redoxreaktionen die Aktivität der sGC und damit auch die Sensitivität von HMR 1766 auf die oxidierte Form der sGC manipulieren? Wichtig für den Aktivitätsstatus der sGC schien auch die oxidative Beeinflussung der Thiolgruppen zu sein (Waldmann und Murad, 1987). Man stellte fest, dass verschiedene Substanzen die Thiolgruppe der sGC modifizieren konnten, welches in einer veränderten Aktivität der sGC resultierte (Lucas et al., 2000). Aus Versuchen mit Häm-oxidiert und Häm-freier sGC ging hervor, dass die ROS-sensitive Thiolgruppe sich in unmittelbarer Nähe des Häms der sGC befinden musste (Wingerter, 2005). Eine Interaktion jener mit der Häm-Bindungsdomäne ist somit möglich. Dies würde eine Aktivitätsveränderung der sGC durch z.B. eine Oxidation von Thiolgruppen erklären.

Wie schon erwähnt, zeigte HMR 1766 als Häm-unabhängiger Aktivator der sGC eine positive Wirkung auf die Häm-freien sGC-Mutanten H105F und H105C. Doch es wurde festgestellt, dass ROS (wie z.B. Wasserstoffperoxid) die positive Ansprechbarkeit des sGC-Aktivators HMR 1766 auf diese sGC-Mutanten vermindert. Es musste angenommen werden, dass es zu einer Oxidation der Thiolgruppen dieser sGC-Mutanten durch Wasserstoffperoxid gekommen war (Zhou et al., 2008). Sicherlich ist diese oxidative Veränderung der Thiolgruppen durch ROS auch in der Wildtypform der sGC denkbar, doch wird jene durch Oxidation des Häms verdeckt. Letztlich konnte Zhou et al. mit diesen Versuchen bekräftigen, dass die positive Wirkung von ROS auf die HMR 1766-induzierte Bildung von cGMP mit der Oxidation des Häms zu erklären ist.

Die sGC ist ein heterodimeres Enzym, das aus der  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Untereinheit besteht. Die Untereinheiten sind in 3 Bereiche aufgeteilt: die N-terminale Domäne, die in der  $\beta$ 1-Untereinheit die Häm-bindende Region enthält (Zhao und Marletta, 1997), die Dimerisierungsdomäne, bestehend aus der NH<sub>2</sub>-terminalen und COOH-terminalen Bindungsstelle (Zhou et al., 2004) und die c-terminale katalytische Domäne (Wedel et al., 1995). Für die Aktivierung der sGC durch HMR 1766 ist die  $\beta$ 1-Untereinheit unabkömmlich. Versuche an sGC-Mutanten konnten dies beweisen: Durch Wegfall der Aminosäuren der  $\alpha$ 1-Untereinheit wurde kein Unterschied in der Aktivierung dieser sGC-Mutanten durch HMR 1766 gesehen. Die sGC-Mutanten, bei denen die Aminosäuren der  $\beta$ 1-Untereinheit fehlten, konnten nicht mehr durch HMR 1766 aktiviert werden (Zhou et al., 2008).

Ein weiterer großer Vorteil von HMR 1766 als NO- und Häm-unabhängiger Aktivator der sGC gegenüber den NO-Donatoren ist die gute Ansprechbarkeit von HMR 1766 auf die cGMP-Synthese auch bei wiederholter Applikation. Es kommt nicht, wie bei NO-Donatoren, zu einer raschen Entwicklung einer Toleranz (Zhou et al., 2008). Dies unterstreicht den therapeutischen Nutzen von HMR 1766 bei der Therapie einer PH.

### **6.3 HMR 1766 und seine Auswirkungen auf das Krankheitsbild der pulmonalarteriellen Hypertonie**

Unter chronischer Hypoxie kommt es zu einer kontinuierlichen Vasokonstriktion, zu hämodynamischen Veränderungen und zu Umbauprozessen in den präkapillären Pulmonalarterien. Durch diese Adaptionsmechanismen entsteht schließlich eine Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie. Die histomorphologischen Veränderungen umfassen die Muskularisierung zuvor nicht muskularisierter kleiner Lungenarterien. Sowohl die Media als auch die Adventitia der Gefäßwände verdicken sich. Die Media zeigt eine Zunahme und eine Hypertrophie glatter Muskelzellen, die Adventitia eine vermehrte Ansammlung von Fibroblasten und Myofibroblasten (Stenmark et al., 2006). Die Intima hingegen bleibt nahezu unverändert (Meyrick und Reid, 1980). Unter Normoxie sind die Veränderungen teilweise reversibel (Sime et al., 1971; Fried und Reid, 1984).



Mit den vorliegenden Experimenten wurde gezeigt, dass HMR 1766 das Voranschreiten einer PH in Mäusen, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren, aufhalten und sogar rückgängig machen konnte. Die Entwicklung der PH bei den Mäusen über einen dreiwöchigen Zeitraum chronischer Hypoxie ist durchaus mit dem Krankheitsbild der Gruppe 3 der PH-Klassifikation beim Menschen zu vergleichen. Eine PH entwickelt sich hier sekundär, Grunderkrankungen betreffen z.B. das respiratorische System, chronisch obstruktive oder interstitielle Lungenerkrankungen, das Schlaf-Apnoe-Syndrom oder auch chronische Höhenexposition. Bei Bewohnern in hohen Lagen, wie z.B. in den Anden und Tibet, führt die ständige Hypoxie zu den beschriebenen physiologischen Umbauprozessen in den kleinen Pulmonalarterien. Weitere Grunderkrankungen sind in der Nizza-Klassifikation der pulmonalen Hypertonie von 2013 beschrieben (siehe Tab. 1 auf Seite 12). Um die klinische Situation einer PH beim Menschen nachzuahmen, wurden die Mäuse in den vorliegenden Versuchen 3 Wochen einer chronischen Hypoxie ausgesetzt. In dieser Zeit entwickelten sie eine PH. Nicht nur die klinische Situation, sondern auch die histomorphologischen Veränderungen in der Gefäßmuskulatur, ausgelöst durch eine PH, wurden so imitiert. Dies wird in der vorliegenden Arbeit anhand des Muskularisierungsgrades der kleinen Pulmonalgefäße in 5.5 verdeutlicht. Mit Hilfe der immunhistochemischen Doppelfärbung gegen alpha smooth muscle actin und von-Willebrand-Faktor VIII konnte durch ein speziell entwickeltes Computerprogramm der Muskularisierungsgrad der einzelnen Pulmonalgefäße eindeutig bestimmt werden. Es wurde zwischen nicht, partiell und voll muskularisierten Gefäßen unterschieden.

Unter der chronischen Hypoxie kommt es zu einem Gefäßumbau der Pulmonalgefäße, dem sogenannten Remodeling. Der Muskularisierungsgrad nimmt zu. Wie in den vorliegenden Diagrammen in 5.5 zu sehen ist, zeigte sich unter der Therapie von HMR 1766 eine Abnahme des Muskularisierungsgrades, nachdem die Mäuse eine PH entwickelt hatten. Der Anteil voll muskularisierter Gefäße sank unter der Therapie mit HMR 1766 signifikant, gleichzeitig stieg der Anteil nicht muskularisierter Gefäße. Somit wurde bereits nach einer zweiwöchigen Therapie mit HMR 1766 das Remodeling aufgehoben.

Als physiologischer Ablauf tritt aufgrund des ständig erhöhten Perfusionswiderstandes in der Lunge eine Hypertrophie des rechten Ventrikels auf. Ein Indikator für die Hypertrophie des rechten Ventrikels ist die Messung des Herzgewichtes des rechten Ventrikels im Verhältnis zum Herzgewicht des linken Ventrikels inklusive des Septums. Somit dient dieser Parameter zum einen zur Beurteilung des Schweregrades einer PH und zum anderen zur Kontrolle einer therapeutischen Maßnahme der PH, wie es im vorliegenden Fall mit

der Substanz HMR 1766 durchgeführt wurde und im Ergebnisteil in 5.4 zu sehen ist. In der Therapiegruppe, die 14 Tage mit HMR 1766 behandelt wurde, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Herzgewichtsverhältnisse gegenüber der unbehandelten hypoxischen Kontrollgruppe. Die Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie unter chronischer Hypoxie konnte mit der Substanz HMR 1766 nicht nur aufgehalten, sondern auch rückgängig gemacht werden. Somit sind auch diese Ergebnisse ein Beweis, dass HMR 1766 das Krankheitsbild der PH in chronisch hypoxischen Mäusen verbessern kann.

Eine Reduktion des rechtsventrikulären systolischen Blutdruckes (RVSP = right ventricular systolic pressure) wurde nicht nur an den therapierten narkotisierten Mäusen festgestellt, sondern wurde auch durch Implantation telemetrischer Sensoren an wachen und frei beweglichen Mäusen gezeigt. Diese Methode reduziert die durch störende Faktoren, wie z.B. Stress oder Narkose, entstandenen Artefakte der gemessenen Parameter erheblich und ist somit eine hervorragende Technik für die direkte rechtsventrikuläre Blutdruckmessung. In 5.3 sind die Ergebnisse der anästhesierten Mäuse und in 5.6 die der telemetrischen Messung zusammengefasst. Eine genaue Beobachtung der Entstehung einer PH über 21 Tage sowie die nachfolgende 14 tägige Phase der Therapie ist somit nachzuvollziehen. Eine Reduktion des RVSP unter HMR 1766 konnte auch nach Auswertung dieser Experimente eindrucksvoll gezeigt werden. Im Lauf der Therapie kam es zur Abnahme der Muskularisierung kleiner Lungengefäße, welche niedrigere Perfusionswiderstände im Lungenkreislauf zur Folge hatte. Somit ist erklärbar, dass der RVSP sich wieder reduzierte.

Viele verschiedene Experimente zum RVSP im Krankheitsbild der PH wurden in der Vergangenheit durchgeführt. Ziel war und ist es, über eine Verringerung des RVSP die PH zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit kam es zwar in einer 14-tägigen Therapie nicht zu einer vollständigen Reduktion des RVSP im Vergleich zu den normoxischen Kontrolltieren, doch stellte sich eine signifikante Reduktion des RVSP im Vergleich zu den hypoxischen Kontrollgruppen ein. Damit ist hier ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Reduktion des RVSP und der Umkehr des Remodelings in den kleinen arteriellen Pulmonalgefäßen zu erkennen, wobei in der 2-wöchigen Therapie mit HMR 1766 die Verbesserung der hämodynamischen Parameter im Vergleich zu den histomorphologischen Gegebenheiten in den pulmonalen Lungengefäßen noch deutlicher ausfallen. Auch in anderen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die histomorphologischen Veränderungen nur langsam zurückgehen und eine enge zeitliche

Beziehung zwischen der Verbesserung der hämodynamischen Parametern und der Umkehr des Gefäßumbaus besteht (Abraham et al., 1971; Meyrick und Reid, 1980; Fried und Reid, 1984). Warum es deutliche zeitliche Unterschiede in der Umkehr des Remodelings in den unterschiedlichen Untersuchungen gibt, kann mit verschiedenen Faktoren zusammenhängen. Zu nennen sind hier die Gattungsunterschiede der Tiere und das unterschiedliche Regenerationspotential der Pulmonalgefäße. Ratten bilden unter chronischer Hypoxie meist eine schwerere Form der PH aus. Die Hypoxie-induzierte PH bei Mäusen fällt dezentler aus (Mam et al., 2010). Außerdem verfügen Mäuse über ein gutes Regenerationspotential des Lungengewebes (Dumitrascu et al., 2008; Fehrenbach et al., 2008). Ferner ist Geschlecht und Entwicklungszustand der Tiere in Bezug auf die unterschiedliche Ausprägung einer PH unter chronischer Hypoxie zu erwähnen (Rabinovitch, et al., 1981).

Einige Therapiemöglichkeiten zur Senkung des RVSP basieren auf einer allgemeinen Senkung des systemisch-arteriellen Blutdruckes (SAP = systemic arterial pressure). Durch die systemische Vasodilatation kommt es zu einer Blutdruckabnahme sowohl im Körper- als auch im Lungenkreislauf.

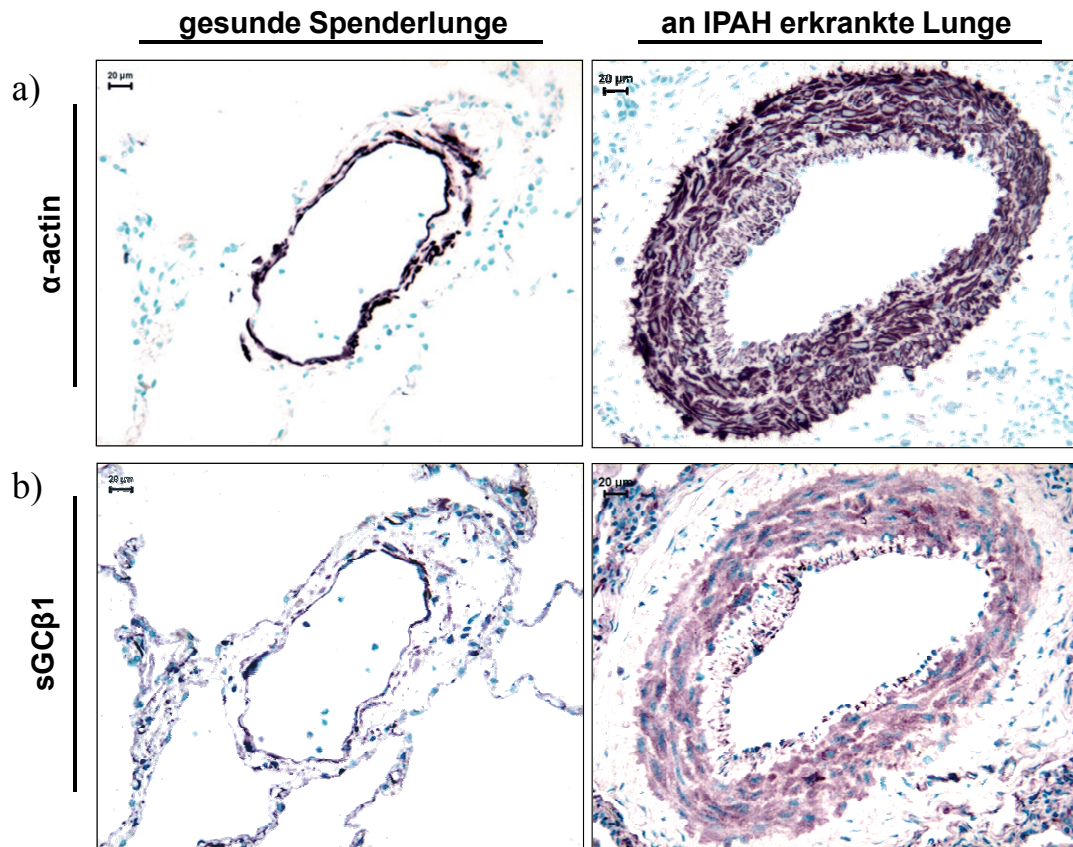
Weißmann et al. zeigten 2009, dass HMR 1766 den systemisch-arteriellen Druck (SAP) nicht verringert. Dieser sGC-Aktivator zeichnet sich durch einen direkten Effekt auf die Pulmonalgefäße aus und hat keine systemisch vasodilatative Wirkung, ein Vorteil gegenüber anderen sGC-Aktivatoren.

In Versuchen mit dem sGC-Stimulator BAY 63-2521 konnte ebenfalls keine systemische Vasodilatation im Ganztiermodell bei Mäusen festgestellt werden (Schermuly et al., 2008). Die hämodynamischen Messungen an den unter chronischer Hypoxie gehaltenen Mäusen ergaben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

In der vorliegenden Arbeit wurde über die telemetrischen Messungen zusätzlich die Herzfrequenz der frei beweglichen Mäuse über die gesamte Zeit festgehalten. Nachdem zunächst durch Progression der PH die Herzfrequenz kontinuierlich über 3 Wochen unter Hypoxie anstieg, war während der Therapie mit HMR 1766 eine Reduktion der Herzfrequenz zu sehen. Auch diese Abnahme ist mit den niedrigeren Perfusionswiderständen aufgrund der Verringerung der Muskularisierung in den kleinen arteriellen Pulmonalgefäßen unter der Therapie sowie mit einer Vasodilatation erklärbar.

Die Möglichkeit, dass HMR 1766 sogar einen direkten kardialen Effekt haben könnte, der zu einer Abnahme der Herzfrequenz führt, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Die Ergebnisse der Bestimmung des Hämatokritwertes aus entnommenen Blutproben der Versuchstiere in 5.1 ergab unter Hypoxie zunächst eine markante Zunahme des Hämatokritwertes. Nach 35 Tagen erreichte er in der Hypoxiegruppe fast doppelt so hohe Werte wie in der normoxischen Kontrollgruppe. Durch Bestimmung des Hämatokritwertes lassen sich Rückschlüsse auf den Anteil der Erythrozyten schließen. Er bezeichnet den Anteil der zellulären Bestandteile (hauptsächlich bestehend aus Erythrozyten) am Volumen des Blutes. Erythrozyten nehmen in den Lungenkapillaren den Sauerstoff auf und transportieren ihn über den Blutkreislauf zu den Kapillaren der Gewebe und der Organe, um ihn dort an die Zellen wieder abzugeben. Um unter chronischer Hypoxie das Defizit an Sauerstoff zu kompensieren, tritt ein physiologischer Adaptionsmechanismus auf: der Mangel an Sauerstoff unter chronische Hypoxie führt zu einer gesteigerten Erythropoese. Somit ist erklärbar, dass unter kontinuierlicher hypoxischer Exposition der Kontrolltiere die Hämatokritwerte von Tag 21 bis Tag 35 weiter ansteigen. Warum allerdings in der Therapiegruppe, die ja weiterhin unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurde, die Hämatokritwerte wesentlich langsamer anstiegen als in der hypoxischen Kontrollgruppe, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Inwiefern die verbesserten hämodynamischen Bedingungen oder gar die Substanz HMR 1766 trotz Hypoxie Einfluss auf die Erythropoese haben, bleibt vorerst offen.

1999 zeigte Li et al., dass eine erhöhte sGC-Expression nach chronischer Hypoxie in der Rattenlunge auftrat. Auch im humanen Lungengewebe von Patienten, die an einer idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH) erkrankten, konnte durch immunhistochemische Färbungen eine starke Expression der  $\beta 1$ -Untereinheit der sGC in den Pulmonalarterien im Vergleich zu den gesunden Spenderlungen nachgewiesen werden (Weißmann et al., 2009, siehe Abb. 21).



**Abb. 21:** Darstellung des Muskularisierungsgrades und der  $\beta 1$ -Untereinheit der sGC aus humanen Lungengefäßen von gesunden (links) und an einer IPAH erkrankten Patienten (rechts). Zum einen wird der Muskularisierungsgrad mit Hilfe der Doppelfärbung gegen alpha-smooth-muscle-actin violett (a) hervorgehoben, zum anderen wird mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (AB 160897 der Firma Cayman Chemical, USA) die  $\beta 1$ -Untereinheit der sGC immunhistochemisch hellrosa (b) gefärbt (aus: Weißmann et al., 2009).

Desweiteren wurde in den vorliegenden Experimenten ein positiver therapeutischer Effekt von HMR 1766 auf die akute Phase der HPV an isolierten Mauslungen festgestellt. Nicht nur die Lungen von normoxisch gehaltenen Mäusen, sondern auch die Lungen zuvor hypoxisch gehaltener Tiere sprachen mit einer deutlichen Reduktion des pulmonalarteriellen Blutdruckes auf HMR 1766 an (siehe 5.2). Der größte hemmende Effekt von HMR 1766 auf die HPV wurde bei der höchsten Konzentration von  $10,0 \mu\text{M}$  gemessen. Besonders ist hervorzuheben, dass dieser konzentrationsabhängige hemmende Effekt von HMR 1766 auf die HPV in den isolierten hypoxischen Mauslungen stärker war als in den

normoxischen Mäusen. Vor allem die hohen Konzentrationen an HMR 1766 führten zu einer stärkeren Verringerung des pulmonalarteriellen Blutdruckes bei den chronisch hypoxischen Mäusen (siehe Abb. 14, Seite 56). Diese Resultate aus den vorliegenden Versuchen sind somit die Folge aus einer stärkeren Aktivierung der sGC aus eben dieser Lungen im Vergleich zu den Lungen der normoxischen Gruppe. Somit stützen diese Ergebnisse aus 5.2 die Interpretation, dass HMR 1766 eine Substanz ist, die bevorzugt die oxidierte und inaktive Form der sGC aktiviert, wie sie in chronisch hypoxischen Mäusen zu finden ist (Schindler et al., 2003; Schindler et al., 2006).

## **6.4 Klinische Relevanz**

Zu eine der wichtigsten Neuerungen in der Forschung neuer Wirkstoffe in den letzten Jahren zählen die NO-unabhängigen Stimulatoren und Aktivatoren der sGC. Diese Substanzen lassen sich in zwei verschiedene Gruppen einteilen. Zu der Gruppe der Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren zählen Verbindungen wie z.B., BAY 41-2272, BAY 41-8534, YC-1, BAY 63-2521, A-350619 und CFM-1571. Diese Wirkstoffe verstärken die Wirkung von NO und können nach einer Oxidation oder Entfernen der prosthetischen Häm-Einheit die sGC nicht mehr aktivieren. Die zweite Gruppe umfasst die sGC-Aktivatoren wie z.B. BAY 58-2667 und HMR 1766. Diese Verbindungen benötigen kein Häm zur Aktivierung der sGC und zeigen eine deutliche Wirkung auf die oxidierte Form der sGC.

Vorklinische und klinische Studien demonstrieren schon jetzt, dass diese Wirkstoffgruppen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz nicht nur für kardiovaskuläre Erkrankungen haben, sondern auch in der Therapie von Nieren-, Leber- und sexuellen Funktionsstörungen Anwendung finden können. Außerdem könnten diese Verbindungen weiterhin einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Pathomechanismen bestimmter Erkrankungen wie z.B. der PH liefern.

Die sGC ist ein heterodimeres Protein, welches die Umwandlung von GTP zu cGMP katalysiert. Sie ist somit ein wichtiges Signalmolekül fast aller Säugetierzellen und reguliert wichtige physiologische Abläufe. Stimuliert wird die Häm-haltige sGC durch NO.

Der NO-Rezeptor existiert in zwei verschiedenen Redoxformen: die NO sensitive, reduzierte ( $\text{Fe}^{2+}$ ) Form und die NO insensitive, oxidierte ( $\text{Fe}^{3+}$ ) Form.

HMR 1766 ist ein Wirkstoff, der im NO-cGMP-Signaltransduktionsweg direkt an der sGC ansetzt. Von entscheidender Bedeutung ist, dass HMR 1766 die oxidierte Form der sGC, die durch NO nicht mehr zu stimulieren ist, aktivieren kann. Die Substanz geht mit der sGC eine Bindung ein, woraus die Bildung des second messengers cGMP folgt.

Durch Steigerung der cGMP-Konzentration können blutdrucksenkende, gefäßerweiternde und gewebesetzende Folgeprozesse vermittelt werden. An dieser Stelle ist unter anderem der gewebesetzende Prozess der Inhibition der Thrombozytenaggregation und -adhäsion zu nennen. Interessant ist dies bei dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus zu betrachten. Durch die endotheliale Dysfunktion bei dieser Erkrankung kommt es zu einer verminderten Produktion endothelialen NOs (Schafer et al., 2004). Diese reduzierte NO-Bioverfügbarkeit führt zu einem gestörten NO-cGMP-Signaltransduktionsweg, was eine erhöhte Plättchenaktivierung zur Folge hat. Massberg et al. zeigten 2002, dass eine Aktivierung der Blutplättchen den Beginn einer Atherosklerose darstellt. Somit ist vorstellbar, dass die Plättchenaktivierung ein Grund für die erhöhte Mortalität bei diabetischen Patienten ist. Im Umkehrschluss wird deutlich, dass eine Inhibition der Plättchenaktivierung die Entwicklung einer Artherosklerose vorbeugt. Flierl zeigte 2009 mit ihren Ergebnissen, dass die Aktivierung der sGC durch HMR 1766 bei an Diabetes mellitus erkrankten Ratten trotz Vorliegen einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit funktioniert. Mit dem sGC-Aktivator HMR 1766 ist es gelungen, die sGC NO-unabhängig und im oxidierten Zustand zu aktivieren. Flierl fand in ihren Experimenten heraus, dass eine NO-unabhängige chronische Aktivierung der sGC durch HMR 1766 zu einer Inhibition der Thrombozytenaktivierung führt. Dies ist bei dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus von ausschlaggebendem Nutzen. Diese aussichtsreichen Ergebnisse von Flierl zeigen, welche große Bedeutung HMR 1766 als zukünftiges Medikament zur Therapie kardiovaskulärer Komplikationen bei dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus haben könnte.

Da NO nur an die reduzierte Form der sGC binden kann, ist das therapeutische Potenzial von NO begrenzt. Während sGC-Stimulatoren das unveränderte Enzym stimulieren und die Wirkung von NO verstärken können, sind sGC-Aktivatoren auch dann in der Lage, die sGC zu aktivieren, wenn es krankheitsbedingt verändert ist und NO nicht mehr an diesem Enzym wirken kann.

Es wird des Weiteren beschrieben, dass unter oxidativem Stress die Expression der sGC vermindert ist. Es kann nur eine geringe Aktivierung der sGC durch NO erfolgen (Bauersachs et al., 1998; Ruetten et al., 1999). Dies alles hat eine Dysfunktion des NO-cGMP-Signalweges zur Folge. Die Aktivierung der sGC ist vermindert, die Produktion an cGMP wird reduziert. Wichtige cGMP-abhängige Effektorsysteme werden beeinträchtigt. Schließlich kommt es zu schweren endothelialen und vaskulären Funktionsstörungen. Koronare Erkrankungen, Bluthochdruck oder Arteriosklerose sind somit erklärbar. Dies verdeutlicht, warum die Suche nach NO-unabhängigen Stimulatoren der sGC in der Forschung auf diesem Gebiet sehr wichtig ist.

Bei der Erkrankung der PH steht wie beim Diabetes mellitus eine Dysfunktion des NO-cGMP-Signalweges der Endothelzellen im Vordergrund. Unter oxidativem Stress ist die Expression der sGC vermindert. Dies hat eine reduzierte Produktion an cGMP zur Folge. Die Proliferation der glatten Muskelzellen in den Pulmonalgefäßen wird ausgelöst, das Gefäßlumen wird somit eingeengt. Schließlich kommt es zu schweren vaskulären Funktionsstörungen, wie sie z.B. bei einer pulmonalen Hypertonie zu sehen sind. Substanzen wie z.B. HMR 1766 verbessern die Regulation der Endothelzellen in den Lungengefäßen. Es senkt den rechtsventrikulären Blutdruck, und das Remodeling der pulmonalen Blutgefäße wird aufgehalten.

Modulationen des NO-cGMP-Signaltransduktionsweges durch Stimulatoren und Aktivator der sGC tragen maßgeblich zur Therapie der PH bei. Nach vielen Experimenten an verschiedenen Tiermodellen ist der Einsatz solcher Substanzen in der Klinik ein nächster Schritt, um bei chronischen Erkrankungen wie der PH weitere therapeutische Ansätze zu liefern.

BAY 63-2521 (Riociguat) ist ein neuartiger Stimulator der sGC und wurde von der Arzneimittelfirma Bayer Healthcare AG entwickelt. Wie auch HMR 1766 zeigt Bay 63-2521 einen positiven Effekt auf das Krankheitsbild der PH. Auch diese Substanz reduziert sowohl den Anteil glatter Muskulatur in den Pulmonalgefäßen als auch die Hypertrophie des rechten Ventrikels. Die zwei großen, randomisierten, doppelblinden und placebo-kontrollierten Phase-3-Studien beim Menschen CHEST-1 (**CH**ronic-thrombo**Em**bolic pulmonary Hypertension sGC-**S**timulator Trial) und PATENT-1 (**P**ulmonary **A**rterial Hyper**TEN**sion sGC-**S**timulator Trial) sind abgeschlossen. Nach einer mehrwöchigen



Therapie wurde die körperliche Belastungsfähigkeit mittels einer 6-Minuten-Gehstrecke evaluiert. Riociguat zeigte bei allen Studienteilnehmer eine Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit (Ghofrani et al., 2013). Patienten, die CHEST-1 oder PATENT-1 durchlaufen haben, können an den Verlängerungsstudien CHEST-2 und PATENT-2 teilnehmen. Auch hier sind schon einige gute Ergebnisse zu verzeichnen. 2015 zeigten Rubin et al., dass eine gute Verträglichkeit über eine Behandlungslänge von einem Jahr diese Substanz auszeichnete. Die Verbesserung der Leistungsfähigkeit wurde bei dieser Verlängerungsstudie zusätzlich unterstrichen und über diese Behandlungsdauer aufrecht gehalten. Riociguat von Bayer Healthcare ist als Adempas® seit Anfang April 2014 von der EMA (European Medicines Agency, Europäische Arzneimittel-Agentur) für die Behandlung zweier Formen des Lungenhochdruckes zugelassen. Damit soll Riociguat als erster Vertreter einer neuen Wirkstoffklasse Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH) helfen.

BAY 63-2521 (Adempas®) und HMR 1766 greifen beide in den Wirkungsmechanismus der NO-cGMP-Signalkaskade ein und führen über einen cGMP-Anstieg in den Lungengefäßen zu einer Vasodilatation. Im Unterschied zu BAY 63-2521 ist HMR 1766 zur Aktivierung der sGC weder auf NO noch auf Häm angewiesen. Somit könnte HMR 1766 als weiterer eigenständiger pulmonaler Vasodilatator eine bessere Alternative zu BAY 63-2521 sein. Außerdem könnte HMR 1766 in der Zukunft als eine weitere Therapieoption bei Patienten dienen, die an einer PH erkrankt sind und ungenügend auf BAY 63-2521 ansprechen.

2014 zeigten Fraccarollo et al., dass die langfristige sGC-Aktivierung durch HMR 1766 zur Steigerung der Herzleistung bei einer fortschreitenden kardialen Dysfunktion nach Myokardinfarkt führte. Die neunwöchige Applikation von HMR 1766 an den erkrankten Ratten reduzierte den linksventrikulären Füllungsdruck und das Lungenödem und verbesserte die Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels und das kardiale Remodeling. Folglich stellt die NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivierung eine therapeutische Möglichkeit da, in Zukunft Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zu behandeln (Fraccarollo et al., 2014).

HMR 1766 erhöht als NO- und Häm-unabhängiger sGC Aktivator die endogene cGMP-Konzentration. Über einen cGMP-Anstieg werden anti-remodeling Effekte wie die Reduktion der Rechtsherzhypertrophie und der Muskularisierung der Pulmonalgefäße begünstigt. Aufgrund der aussichtsreichen Ergebnisse dieser Arbeit verfügt der sGC-Aktivator HMR 1766 über ein vielversprechendes therapeutisches Potential und stellt eine weitere medikamentöse Therapieoption bei pulmonaler Hypertonie dar.

In der Zukunft bedarf es weiterer Forschung, um die Wirksamkeit von HMR 1766 auch in klinischen Studien an Patienten zu evaluieren, die an einer PH erkrankt sind.

## **7 Zusammenfassung**

### **7.1 Zusammenfassung**

Die pulmonalarterielle Hypertonie stellt beim Menschen eine schwere Krankheit dar. Durch pathophysiologische Mechanismen kommt es zu einer pulmonalarteriellen Druckerhöhung im Lungenkreislauf, die arteriellen Lungengefäße verdicken ihre Gefäßmuskulatur und der Durchmesser des Gefäßinnenraumes wird dadurch kleiner. Die langsamen Umbauprozesse der pulmonalen Gefäßmuskulatur führen zu einem dauerhaften Bluthochdruck im Lungenkreislauf. Dies führt zu einer Rechtsherzbelastung, aus der sich schließlich das chronische Cor pulmonale entwickelt. Der klinische Verlauf beim Menschen ist gekennzeichnet durch fortschreitende Dyspnoe, Leistungsschwäche, Kreislaufstörungen und Müdigkeit. Ohne eine Behandlung führt die Erkrankung durch Rechtsherzversagen in nur wenigen Jahren zum Tod.

Bis heute ist keine Heilung von pulmonalarterieller Hypertonie möglich. Es gibt allerdings einige vielversprechende Therapieansätze. In den letzten Jahren wurden Substanzen entwickelt, die die lösliche Guanylatzyklase unabhängig von Stickstoffmonoxid aktivieren und somit einen neuartigen Ansatz für die Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie liefern können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Substanz HMR 1766 als Aktivator der löslichen Guanylatzyklase untersucht. Es konnte an Mäusen, die experimentell unter chronischer Hypoxie eine pulmonalarterielle Hypertonie entwickelten, gezeigt werden, dass unter der Therapie mit HMR 1766 ein Voranschreiten der pulmonalarteriellen Hypertonie gestoppt und sogar rückgängig gemacht werden konnte. Durch histomorphometrische Untersuchungen konnte dargestellt werden, dass HMR 1766 die Gefäßumbauprozesse in den Pulmonalarterien reduzierte und somit eine Umkehrung des sogenannten Remodeling der pulmonalarteriellen Gefäße herbeiführte. Unter der Therapie mit HMR 1766 kam es zur Abnahme des rechtsventrikulären Blutdruckes.

Die Herzgewichtsverhältnisse spielen als Merkmal einer Rechtsherzhypertrophie eine wichtige Rolle in der PH. Unter der Therapie mit HMR 1766 nahm das Gewicht des rechten Herzens ab und die Herzgewichtsverhältnisse reduzierten sich.

Die neuartige Methode der Implantation telemetrischer Sensoren in den Versuchsmäusen bot die Möglichkeit der kontinuierlichen Messung des rechtsventrikulären systolischen

Blutdruckes und der Herzfrequenz. Auch hier wurde eine Reduktion dieser Parameter unter der Therapie mit HMR 1766 an den erkrankten Mäusen gezeigt.

Seit 2014 ist Riociguat (Adempas®), ein NO-unabhängiger, aber Häm-abhängiger Stimulator der sGC, für die Behandlung der idiopathischen pulmonalerteriellen und der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie zugelassen. Ließen sich die Untersuchungen und Ergebnisse dieser Arbeit auf den Menschen übertragen, so könnte die Substanz HMR 1766 eine bessere Wirksamkeit im Vergleich zu Riociguat zeigen, weil sie die sGC nicht nur NO-, sondern auch Häm-unabhängig aktiviert. Somit böte HMR 1766 eine zusätzliche Behandlungsoption für Menschen, die an einer pulmonalerteriellen Hypertonie erkrankt sind.

## 7.2 Summary

Pulmonary arterial hypertension is a serious pulmonary vascular disorder in humans that is characterized by elevated pulmonary arterial pressure, increased muscularization of the lung arteries, and pulmonary vascular constriction. The pathomechanisms cause a persistent hypertension in the pulmonary circulation. This leads to a right heart strain, from which eventually the chronic cor pulmonale develops. The clinical course in humans is characterized by progressive dyspnoea, inefficiency, circulatory disorders and fatigue. Without treatment, the disease can lead to death in just a few years.

To date, no cure of pulmonary arterial hypertension is possible. However, there are some promising therapeutic approaches. In recent years, substances have been developed that activate soluble guanylate cyclase independent of nitric oxide and thus provide a novel approach for the therapy of pulmonary arterial hypertension.

In the present study, HMR 1766 was investigated as an activator of soluble guanylate cyclase. It was shown in mice who developed pulmonary arterial hypertension under chronic hypoxia that under the therapy with HMR 1766, a progression of pulmonary arterial hypertension could be stopped and even reversed. Histomorphometric analysis demonstrated that HMR 1766 reduced vascular reconstruction processes in the pulmonary arteries and thus reversed the so-called remodeling of the pulmonary arterial vessels. Under the therapy with HMR 1766, the right ventricular blood pressure decreased.

The heart-weight ratios play an important role in the PH as a feature of right heart hypertrophy. Under treatment with HMR 1766, the weight of the right heart reduced and the heart weight ratios decreased.

The novel method of implanting telemetric sensors in the experimental mice offered the possibility of continuously measuring right ventricular systolic blood pressure and heart rate. Here, too, a reduction of these parameters was shown under the therapy with HMR 1766 in the diseased mice.

Since 2014, Riociguat (Adempas®), a NO-independent but heme-dependent stimulant of the sGC, has been approved for the treatment of idiopathic pulmonary arterial as well as of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. If the investigations and results of this work are transferable to humans, the substance HMR 1766 could be an alternative to riociguat, which activates the sGC not only NO- but also heme-independent. Thus, HMR 1766 provides an additional treatment option for people suffering from pulmonary arterial hypertension.

## 8 Literaturverzeichnis

Abraham AS, JM Kay, RB Cole, AC Pincock. *Haemodynamic and pathological study of the effect of chronic hypoxia and subsequent recovery of the heart and pulmonary vasculature of the rat.* Cardiovasc Res 5(1):95-102, 1971

Anand IS, E Harris, R Ferrari, P Pearce, P Harris. *Pulmonary haemodynamics of the yak, cattle, and cross breeds at high altitude.* Thorax 41(9):696-700, 1986

Arias-Stella J und M Saldana. *The Terminal Portion of the Pulmonary Arterial Tree in People Native to High Altitudes.* Circulation 28:915-925, 1963

Ballou DP, Y Zhao, PE Brandish, MA Marletta. *Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect.* Proc Natl Acad Sci USA 99:12097-12101, 2002

Bauersachs J, A Bouloumie, A Mülsch, G Wiemer, I Fleming, R Busse. *Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production.* Cardiovasc Res 37:772-779, 1998

Bartels H, P Dejours, H Kellogg, J Mead. *Glossary on respiration and gas exchange.* J Appl Physiol 34:549-558, 1973

Beavo JA. *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms.* Physiol Rev 75/4:725-748, 1995

Bender AT und JA Beavo. *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use.* Pharmacol Rev 58:488-520, 2006

Berg JM, JLTymoczko, L Stryer. *Stryer Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, 2007

Bradford J und Dean H. *The pulmonary circulation*. J Physiol 16:34-96, 1894

Budhiraja R, RM Tuder, PM Hassoun. *Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension*. Circulation 109 (2):159-165, 2004

Buechler WA, K Ivanova, G Wolfram, C Drummer, JM Heim und R Gerzer. *Soluble Guanylyl Cyclase and Platelet Function*. Ann N Y Acad Sci 714:151-157, 1994

Cai H und DG Harrisson. *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res 87:840-844, 2000

Campbell AI, Y Zhao, R Sandhu, DJ Stewart. *Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Circulation 104(18):2242-2248, 2001

Chrystal RG und JB West (Hrsg.). In: *The Lung*. Raven Press New York, 1991

Cutaia, M und Rounds. *Hypoxic pulmonary vasoconstriction: Physiology and Pathophysiology*. Journal of Intensive Care Medicine 4:186-191, 1989

Denninger JW und MW Marletta. *Guanylate cyclase and the NO/cGMP signalling pathway*. Biochem Biophys Acta 1411:334-350, 1999

Dierks EA und JN Burstyn. *The deactivation of soluble guanylyl cyclase by redoxactive agents*. Arch Biochem Biophys 351:1-7, 1998

Dumitrascu R, N Weissmann, HA Ghofrani, E Dony, K Beuerlein, H Schmidt, JP Stasch, MJ Gnoth, W Seeger, F Grimminger, RT Schermuly. *Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling*. Circulation 113(2):286-295, 2006

Dumitrascu R, S Koebrich, E Dony, N Weissmann, R Savai, SS Pullamsetti, HA Ghofrani, A Samidurai, H Traupe, F Seeger, F Grimminger F, RT Schermuly.

*Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury.* BMC Pulm Med 8:25, 2008

Durmowicz AG, S Hofmeister, TK Kadyraliev, AA Aldashev, KR Stenmark. *Functional and structural adaptation of the yak pulmonary circulation to residence at high altitude.* J Appl Physiol 74(5):2276-2285, 1993

von Euler US und G Liljestrand. *Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat.* Acta Physiol Scan 12:301-320, 1946

Emergy, C. J. *Vascular remodelling in the lung.* Eur Respir J 7:217-219, 1994

Evgenov OV, F Ichinose, NV Evgenov, MJ Gnoth, GE Falkowski, Y Chang, KD Bloch, WM Zapol. *Soluble guanylate cyclase activator reverses acute pulmonary hypertension and augments the pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in awake lambs.* Circulation 110:2253-2259, 2004.

Evgenov OV, P Pacher, PM Schmidt, G Hasko, HH Schmidt, JP Stasch. *NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential* Nat Rev Drug Discov 5:755-768, 2006

Fagan KA, B Morrissey, BW Fouty. *Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension.* Respir Res 2:306-313, 2001

Faller A. *Der Körper des Menschen.* 12. Auflage, Thieme-Verlag: Stuttgart, NewYork, 1995

Fehrenbach H, R Voswinckel, V Michl, T Mehling, A Fehrenbach, W Seeger, JR Nyengaard. *Neoalveolarisation contributes to compensatory lung growth following pneumonectomy in mice.* Eur Respir J 31(3):515-22, 2008



Feron O, L Belhassen, L Kobzik, TW Smith, RA Kelly, T Michel. *Endothelial nitric oxide targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells*. J Biol Chem 271:22810-22814, 1996

Fishman AP (Hrsg.). In: *Pulmonary Diseases and Disorders*. Second edition. Mc Graw-Hill Book-Company, 1998.

Flierl U. *Einfluss der chronischen Aktivierung der Guanylatcyclase auf die Regulation der Thrombozytenaktivität bei Diabetes mellitus*. Dissertation Universität Würzburg, 2009

Folkow B, M Hallbäck, Y Lundgren, R Sivertsson, L Weiss. *Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension, studied in man and in spontaneously hypertensive rats*. Circ Res 32:Suppl 1:2-16., 1973

Fraccarollo D, P Galuppo, S Motschenbacher, H Ruetten, A Schäfer, J Bauernsachs. *Soluble guanylyl cyclase activation improves progressive cardiac remodeling and failure after myocardial infarction. Cardioprotection over ACE inhibition*. Basic Res Cardiol 109(4):421, 2014

Friebe A und D Koesling. *Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. Circ Res 93:96-105, 2003

Fried R und Reid L. *Early recovery from hypoxic pulmonary hypertension: a structural and functional study*. J Appl Physiol 57:1247-1253, 1984

Fuch B, N Sommer, A Dietrich, RT Schermuly, HA Ghofrani, F Grimminger, W Seeger, T Gudermann, N Weissmann. *Redox signaling and reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction*. Respiratory Physiology & Neurobiology 174(3):282-91, 2010

Fukuto JM: *Chemistry of nitric oxide: biologically relevant aspects*. Adv Pharmacol 34:1-15, 1995

Fulton RM, EC Hutchinson, A Morgan Jones. *Ventricular weight in cardiac Hypertrophy*: Br Heart J 4:413-420, 1952

Furchgott RF und JV Zawadzki. *The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin*. Nature 288:373-376, 1980

Galie, N, A Torbicki, R Barst, P Darteville, S Haworth, T Higenbottam, H Olschewski, A Peacock, G Pietra, LJ Rubin, G Simonneau. *Guidlines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J 25:2243-2278, 2004

Galle J, U Zabel, U Hubner, A Hatzelmann, B Wagner, C Wanner, HHHW Schmidt. *Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity*. Br J Pharmacol. 127:195-203, 1999

Gamboa R und E Marticorena. *The ductus arteriosus in the newborn infant at high altitude*. Vasa 1(3):192-195, 1972

Ghofrani HA, J Pepke-Zaba, JA Barbera, R Channick, AM Keogh, MA Gomez-Sanchez, M Kneussl, F Grimminger. *Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension*. J Am Coll Cardiol 43:68S-72S, 2004

Ghofrani HA, N Galiè, F Grimminger, E Grünig, M Humbert, ZC Jing, AM Keogh, D Langleben, MO Kilama, A Fritsch, D Neuser, LJ Rubin. *Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension*. N Engl J Med 25;369(4):330-40, 2013

Giaid A und D Saleh. *Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension*. N Engl J Med 27;333(4):214-21, 1995

Goyal P, N Weissmann, F Grimminger, C Hegel, L Bader, F Rose, L Fink, HA Ghofrani, RT Schmeruly, HH Schmidt, W Seeger, J Hanze. *Upregulation of NADH(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species*. Free Radic Biol Med 36:1279-1288, 2004

Gutner HP, P Walser, B Fässler. *Normal values for pulmonary hemodynamics at rest and during exercise in man*. Progr Resp Res 9:295-315, 1975

Guzik TJ und DG Harrison. *Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies*. Drug Discov Today 11:524-533, 2006

Hampl V und J Herget. *Role of Nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension*. Physiol Rev 80:1337-1372, 2000

Hare JM. *Nitroso-redox balance in the cardiovascular system*. N Engl J Med 351:2112-2114, 2004

Hatano S und T Strasser. *Primary pulmonary hypertension report on a WHO meeting Geneva*. World Health Organisation, 1975

Hardman JG und EW Sutherland. *Guanylcyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3'5'-monophosphate from guanosine triphosphate*. J Biol Chem 10;244(23):6363-6370, 1969

Hermle G, H Schuette, D Walmrath, K Geiger, W Seeger, F Grimminger. *Ventilation-perfusion mismatch after lung ischemia-reperfusion. Protective effect of nitric oxide*. Am J Respir Crit Care Med 160:1179-1187, 1999

Hillier SC, JA Graham, CC Hanger, PS Godbey, RW Glenny, WW Wagner Jr. *Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules*. J Appl Physiol 82:1084-1090, 1997

Hink U, N Tsimilimingas, M Wendt, T Munzel. *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus: therapeutic implications*. Treat Endocrinol 2:293-304, 2003

Hofmann F, R Feil, T Kleppisch, J Schlossmann. *Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion*. Pysiol Rev 86:1-23, 2006

Humbert M, G Monti, M Fartoukh, A Magnan, F Brenot, B Rain, F Capron, P Galanaud, P Duroux, G Simonneau, D Emilie. *Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients*. Eur Respir J 11(3):554-559, 1998

Ichinose F, JD Jr Roberts, WM Zapol. *Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential*. Circulation 29;109(25):3106-11, 2004

Ignarro LJ, JN Degnan, WH Baricos, PJ Kadowitz, MS Wolin. *Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung*. Biochem Biophys Acta 718:49-59, 1982

Ignarro LJ, GM Buga, KS Wood, RE Byrns, G Chadhuri. *Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci USA 84:9265 – 9269, 1987

Ignarro LJ. *After 130 years, the molecular mechanisms of action of nitroglycerin is revealed*. Proc Natl Acad Sci USA 99:7816-7817, 2002

Jacke K, K Witte, B Lemmer. *Mechanisms involved in the blunted nitric oxide-cGMP pathway in hypertensive TGR(mREN2)27 rats*. Eur J Pharmacol 415:27-30, 2001

Jaffrey SR und SH Snyder. *Nitric Oxide: a Neural Messenger*. Annu Rev Cell Dev Biol 11:417-440, 1995

Jolin A und L Bjertnaes. *Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the adult respiratory distress syndrom*. Acta Anaesthesiol Scan 35 (Suppl.):40-54, 1991

Kamisaki Y, S Saheki, M Nakane, JA Palmieri, T Kuno, BY Chang, SA Waldmann, F Murad. *Soluble guanylate cyclase from rat lung exist as a heterodimer*. J Biol Chem 261:7236-7241, 1986

Katsuki S, W Arnold, C Mittal, F Murad. *Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine*. J Cyclic Nucleotide Res 3:23-25, 1977

Ko FN, CC Wu, SC Kuo, FY Lee, CM Teng. *YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase*. Blood 84/12:4226-4233, 1994

Kuhn M. *Structure, regulation and function of mammalian membrane guanylylcyclase receptors, with a focus on guanylylcyclase-A*. Circ Res 93:700-709, 2003

Kwapiszewska G, M Wygrecka, LM Marsh, S Schmitt, R Trosser, J Wilhelm, K Helmus, B Eul, A Zakrzewicz, HA Ghofrani, RT Schermuly, RM Bohle, F Grimminger, W Seeger, O Eickelberg, L Fink, N Weissmann. *Fhl-1, a new key protein in pulmonary hypertension*. Circulation 118 (11):1183-1194, 2008

Lahiri S, GC Di, A Roy. *Lessons from chronic intermittent and sustained hypoxia at high altitudes*. Respir Physiol Neurobiol 130:223-233, 2002.

Lamothe M, FJ Chang, N Balashova, R Shirokov, A Beuve. *Functional characterizing of nitric oxide and YC-1 activation of soluble guanylyl cyclase: structural implication for the YC-binding site*. Biochemistry 43:3039-3048, 2004

Le Cras TD, C Xue, A Rengasamy, RA Johns. *Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung*. Am J Physiol 270:L164-L170, 1996

Li D, N Zhou, RA Johns. *Soluble guanylate cyclase gene expression and localization in rat lung after exposure to hypoxia*. Am J Physiol 277:L841-L847, 1999

Li D, VE Laubach, RA Johns. *Upregulation of lung soluble guanylate cyclase during chronic hypoxia is prevented by deletion of eNOS*. Am J Physiol 281:L369-L376, 2001

Lucas KA, GM Pitari, S Kazerounian, I Ruiz-Stewart, J Park, S Schulz, KP Chepenik, SA Waldman. *Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP*. Pharmacol Rev 52:375-414, 2000

Mam V, AF Tanbe, SH Vitali, E Arons, HA Christou, RA Khalil. *Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats*. J Pharmacol Exp Ther 332(2):455-462, 2010

Marczin N und D Royston. *Nitric oxide as mediator, marker and modulator of microvascular damage in ARDS*. BR J Analst 87/2:179-183, 2001

Massberg S, K Brand, S Gruner, S Page, E Muller, I Muller, W Bergmeier, T Richter, M Lorenz, I Konrad, B Nieswandt, M Gawaz. *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation*. J Exp Med 196:887-896, 2002

Max M und R Rossaint. *nitric oxide inhalation in pulmonary hypertension an severe respiratory failure*. Curr Opin Cardiol 14:423-6, 1999

Melichar VO. *Einfluß der Artherosklerose auf den NO/cGMP Signalweg am Modell des cholesteringefütterten Kaninchen*. Dissertation Universität Würzburg, 2002

Melichar VO, D Behr-Roussel, U Zabel, LO Uttenthal, J Rodrigo, A Rupin, TJ Verbeuren, HSA Kumar, HH Schmidt. *Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci USA 101:16671-16676, 2004

Mergia E, M Russwurm, G Zoidl, D Koesling. *Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain*. Cell Signal 15:189-195, 2003

Meyrick B und L Reid. *Hypoxia-induced structural changes in the media an adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression*. Am J Pathol 100:151-178, 1980

Mittendorf J, S Weigand, C Alonso-Alija, et al.: *Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension*. ChemMedChem. 4, Nr. 5, S. 853–65, 2009

Moncada S, RM Palmer, EA Higgs. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology*. Pharmacol Rev 43/2:109-142, 1991

Moore LG. *Human genetic adaptation to high altitude*. High Alt Med Biol 2(2):257-279, 2001

Mullershausen F, D Koesling, A Friebe. *No-sensitive guanylyl cyclase and NO-induced feedback inhibition in cGMP signalling*. Front biosci 10:1269-1278, 2005

Mulsch A, J Bauersachs, A Schäfer, JP Stasch, R Kast, R Busse. *Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators*. Br J Pharmacol 120:681-689, 1997

Mulvany MJ, U Baandrup, HJ Gundersen. *Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector*. Circ Res 57(5):794-800, 1985

Nathan C und Q-W Xie. *Nitric Oxide synthases: Roles, tolls and controllols*. Cell 78:915-918, 1994

Nickel R, A Schummer, E Seiferle. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III Kreislaufsystem*. 3. Auflage, Blackwell Wissenschaftsverlag: Berlin, Wien, 1996

Olschewski H, W Seeger, F Grimminger. *Physiologie und Pathophysiologie der pulmonalen Zirkulation*. Internist 40:696-709, 1999

Olschewski H und W Seeger. *Pulmonale Hypertonie, Pathophysiologie, allgemeine Maßnahmen und Entwicklung einer pulmonal selektiven Therapie*. UNI-MED Bremen, London, Boston, 2000

Olschewski H, A Ghofrani, R Wiedemann, F Rose, B Enke, T Gessler, R Voswinckel, M Kohstall, F Grimminger, W. Seeger. *Pulmonaler Hochdruck*. Internist 43:1498-1509, 2002

Paddenberg R, B Ishaq, A Goldenberg, P Faulhammer, F Rose, N Weissmann, RC Braun-Dullaeus, W Kummer. *Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284:L710-L719, 2003

Palmer RMJ, AG Ferrige, S Moncada. *Nitric oxide accounts for the activity of endothelium derived relaxing factor*. Nature 327:524-526, 1987

Palmer RMJ, DC Ashton, S Moncada. *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature 333:664-666, 1988

Papale D, C Bruckmann, B Gazur, C Miles, C Mowat, S Daff. *Oxygen activation in neuronal NO synthase: resolving the consecutive mono-oxygenation steps*. Biochemical Journal 443 (2) 505-514, 2012

Prabhakar NR und GK Kumar. *Oxidativ stress in the systemic and cellular responses to intermittent hypoxia*. Biol Chem 385:217-221, 2004.

Prabhakar P, V Cheng, T Micheal. *A chimeric transmembrane domain directs endothelial nitric oxide synthase palmitoylation and targeting to plasmalemmal caveolae*. J Biol Chem 275:19416-19421, 2000

Pryor WA und GL Squadrito. *The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide*. Am J Physiol 268:699-722, 1995

Pullamsetti S, L Kiss, HA Ghofrani, R Voswinckel, P Haredza, W Klepetko, C Aigner, L Fink, JP Muyl, N Weissmann, F Grimminger, W Seeger, RT Schermuly. *Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension*. FASEB J 19(9):1175-7, 2005

Rabinovitch M, W Gamble, AS Nadas, OS Miettinen, L Reid. *Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features*. Am J Physiol 236:H818-H827, 1979

Rabinovitch M, WJ Gamble, OS Miettinen, L Reid. *Age and sex influence on pulmonary hypertension of chronic hypoxia and on recovery*. Am J Physiol 240:H62-H72, 1981

Reinhold P und P Höchel. *Pathophysiologische Reaktionen des pulmonalen Kreislaufsystems auf Atemwegs- und Lungenerkrankungen*. Berl Münch Tierärztl Wschr 118,52-66, 2005



Ressler J, D Urbanova, J Widimsky, B Ostadal, V Pelouch, J Prochazka. *Reversibility of pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy induced by intermittent high altitude hypoxia in rats*. Respiration 31:38-46, 1974

Rhodes J. *Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease*. J Appl Physiol 98:1092-1100, 2005

Riede U-N und H-E Schäfer (Hrsg.). In: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Aufl. Thieme, Stuttgart. 1993.

Rosenkranz S. *Cor pulmonale und pulmonale Hypertonie*. Journal Herz Volume 39:58-65, 2014

Rothermund L, A Friebe, M Paul, D Koesling, R Kreutz. *Acute Blood pressure effects of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase, in normotensive and hypertensive rats*. BR J Pharmacol 130:205-208, 2000

Rubin LJ. *Current concepts: primary pulmonary hypertension* N Engl J Med 336:111-17, 1997

Rubin LJ, N Galiè, F Grimminger, E Grünig, M Humbert, ZC Jing, A Keogh, D Langleben, A Fritsch, F Menezes, N Davie, HA Ghofrani. *Riociguat for treatment of pulmonary arterial hypertension: a long-term extension study (PATENT-2)*. Eur Resp J 45:1303-1313, 2015

Ruetten H, U Zabel, W Linz, HH Schmidt. *Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats*. Circ Res 85:534-541, 1999

Russwurm M und D Koesling. *Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase*. Mol Cell Biochem 230/1-2:159-164, 2002

Schafer A, NJ Alp, S Cai, CA Lygate, S Neubauer, M Eigenthaler, J Bauersachs, KM Channon. *Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1720-1726, 2004

Schermuly R, JP Stasch, SS Pullamsetti, R Middendorff, D Mueller, KD Schlüter, A Dingendorf, S Hackemack, E Kolosionek, C Kaulen, R Dumitrascu, N Weissmann, J Mittendorf, W Klepetko, W Seeger, HA Ghofrani, F Grimminger. *Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension*. Eur Respir J 32:881–891, 2008

Schindler U, H Strobel, K Schonafinger, H Rütten, W Linz, M Just, S Schäfer, PW Schindler, AE Busch, A Mülsch. *Pharmacology and biochemistry of novel compounds activating heme oxidized soluble guanylyl cyclase*. 1<sup>st</sup> International Conference on cGMP, Leipzig, Germany Abstract, 2003

Schindler U, H Strobel, K Schonafinger, W Linz, M Lohn, PA Martorana, H Rutten, PW Schindler, AE Busch, M Sohn, A Topfer, A Pistorius, C Jannek, A Mülsch. *Biochemistry an pharmacology of novel anthranilic acid derivates activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclise*. Mol Pharmacol 69:1260-1268, 2006

Schmidt K, A Schrammel, D Koesling, B Mayer. *Molecular mechanism involved in the synergistic activationn of soluble guanylyl cyclase by YC-1 and nitric oxide in endothelial cells*. Mol Pharmacol 59:220-224, 2001

Schmidt PM. *Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur NO-unabhängigen Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase*. Dissertation: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2003

Schmidt PM, M Schramm, H Schröder, F Wunder, JP Stasch . *Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase*. J Biol Chem 279:3025-3032, 2004

Schmidt RF, G Thews. *Physiologie des Menschen*. 27. Auflage, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 1997

Schrammel A, S Behrends, K Schmidt, D Koesling, B Mayer. *Characterization of 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. Mol Pharmcol 50:1-5, 1996

Schultz G, E Bohme, K Munske. *Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity.* Life Sci 8(24):1323-1332, 1969

Sime F, D Penaloza, L Ruiz. *Bradycardia, increased cardiac output, and reversal of pulmonary hypertension in altitude natives living at sea level.* Br Heart J 33(5):647-657, 1971

Simonneau G, N Galie, LJ Rubin, D Langleben, W Seeger, G Domenighetti, S Gibbs, D Lebrec, R Speich, M Beghetti, S Rich, A Fishman. *Clinical classification of pulmonary hypertension.* J Am Coll Cardiol 43(12 Suppl S.):5S-12S, 2004

Stamler JS, DJ Singel, J Loscalzo. *Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms.* Science 258:1898-1902, 1992

Stasch JP, EM Becker, C Alonso-Alija, H Apeler, K Debowsky, A Feurer, R Gerzer, T Minuth, E Perzborn, U Pleiss, H Schröder, W Schröder, E Stahl, W Steinke, A Straub, M Schramm. *No-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase.* Nature 410:212-215, 2001

Stasch JP, C Alonso-Alija, H Apeler, K Debowsky, A Feurer, T Minuth, E Perzborn, A Straub, M Schramm. *Pharmacological actions of a novel No-independent guanylyl cyclase stimulator Bay 41-8543: in vivo studies.* Br J Pharmacol 135:333-343, 2002a

Stasch JP, K Debowsky, E Perzborn, E Stahl, M Schramm. *Cardiovascular actions of a novel No-independent guanylyl cyclase stimulator Bay 41-8543: in vivo studies.* Br J Pharmacol 135:344-355, 2002b

Stasch JP, P Schmidt, C Alonso-Alija, H Apeler, K Debowsky, M Härtner, M Heil, T Minuth, E Perzborn, U Pleiss, M Schramm, W Schröder, H Schröder, E Stahl, W Steinke, F Wunder. *No- and haemindependent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle.* Br J Pharmacol 136:773-783, 2002c

Stasch JP. *NO-unabhängige Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase*. Habilitation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2003

Stasch JP, PM Schmidt, PI Nedvetsky, TY Nedvetskaya, HSA Kumar, S Meurer, M Deile, A Taye, A Knorr, H Lapp, H Müller, Y Turgay, C Rothkegel, A Tersteegen, B Kemp-Harper, W Müller-Esterl, HHHW Schmidt. *Targeting the heme oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels*. J Clin Invest 116:2552-2561, 2006

Staub NC. *Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction*. Chest 88:240S-245S, 1985

Stefanini M, C De Martino, L Zamboni. *Fixation of Ejaculated Spermatozoa for Electron Microscopy*. Nature 216, 173-174, 1967

Stenmark KR, KA Fagan, MG Frid. *Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms*. Circ Res 99(7):675-691, 2006

Stenmark KR, VN Davie, M Frid, E Gerasimovskaya, M Das. *Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling*. Physiology (Bethesda.) 21:134-145, 2006

Stone JR, RH Sands, R Dunham, MA Marletta. *Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosylheme complex on soluble guanylyl cyclase*. Biochem Biophys Res Comm 15;207(2):572-7, 1995

Straub A, JP Stasch, C Alonso-Alija, J Benet-Buchholz, B Ducke, A Feurer, C Fürstner. *NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase*. Bioorg Med Chem Lett 26;11(6):781-4, 2001

Tanaka Y, DP Schuster, EC Davis, GA Patterson, MD Botney. *The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling*. J Clin Invest Vol 98 No 2, 434-442, 1996

Tesmer JJ und SR Sprang. *The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase*. Curr Opin Struct Biol 8:713-719, 1998

Tucker A und J Rhodes. *Role of vascular smooth muscle in the development of high altitude pulmonary hypertension: an interspecies evaluation*. High Alt Med Biol 2(2):173-189, 2001

Urbanova D, J Ressler, J Widimsky, B Ostadal, V Pelouch, J Prochazka. *Pulmonary vascular changes induced by intermittent altitude hypoxia and their reversibility in rat*. Beitr Pathol 150:389-399, 1973

van Suylen RJ, JF Smits, MJ Daemen. *Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med 157(5/1):1423-1428, 1998

Voelkel N F. *Mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction*. Am Rev Respir Dis 133:1186-1194, 1986

Voelkel NF und RM Tuder. *Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension*. Eur Respir J 8:2129-2138, 1995

Waldmann SA und F Murad. *Cyclic GMP synthesis and function*. Pharmacol Rev 39:163-196, 1987

Warner TD, JA Mitchell, H Sheng, F Murad. *Effects of Cyclic GMP on Smooth Muscle Relaxation*. Adv Pharmacol 26:171-194, 1994

Warnholtz A, G Nickenig, E Schulz, R Macharzina, JH Brasen, M Skatchkov, T Heitzer, JP Stasch, KK Griendling, DG Harrison, M Bohm, T Meinertz, T Munzel. *Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system*. Circulation 99:2027-2033, 1999

Waypa GB, JD Marks, MM Mack, C Boriboun, PT Mungai, PT Schumacker. *Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes*. Circ Res 91:719-726, 2002

Wedel B, C Harteneck, J Foerster, A Friebe, G Schultz, D Koesling. *Functional domains of soluble guanylyl cyclase*. J Biol Chem 270:24871–24875, 1995

Wegener JW, I Gath, U Forstermann, H Nawrath. *Activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 in aortic smooth muscle but not in ventricular myocardium from rat*. Br J Pharmacol 122/7:1523-1529, 1997

Weir EK, J Lopez-Barneo, KJ Buckler, SL Archer. *Acute Oxygen-sensing mechanisms*. N Engl J Med 353:2042-2055, 2005

Weisel FC, C Kloepping, A Pichl, A Sydykov, B Kojonazarov, J Wilhelm, M Roth, KM Ridge, K Igarashi, K Nishimura, W Maison, C Wackendorff, W Klepetko, P Jaksch, HA Ghofrani, F Grimminger, W Seeger, RT Schermuly, N Weissmann, G Kwapiszewska. *Impact of S-Adenosylmethionine Decarboxylase 1 on Pulmonary Vascular Remodeling*. Circulation 129:1510-1523, 2014

Weissmann N, F Grimminger, D Walmrath, W Seeger. *Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs*. Respir Physiol 100(2):159-69, 1995

Weissmann N, A Tadic, J Hanze, F Rose, S Winterhalder, M Nollen, RT Schermuly, HA Ghofrani, W Seeger, F Grimminger. *Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>?* Am J Physiol 279:L683-L690, 2000

Weissmann N, F Grimminger, A Olschewski, W Seeger. *Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281(2):L314-L317, 2001

Weissmann N. *Vascular effect of alveolar hypoxia - sensing and signal transduction mechanisms*. In: Pneumologie 56:511-513, Georg Thieme Verlag, 2002

Weissmann N, M Nollen, B Gerigk, HA Ghofrani, RT Schermuly, A Gunther, K Quanz, L Fink, J Hanze, F Rose, W Seeger, F Grimminger. *Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide*. Am J Physiol 284:H931-H938, 2003

Weissmann N, E Akkayagil, K Quanz, RT Schermuly, HA Ghofrani, L Fink, J Hanze, F Rose, W Seeger, F Grimminger. *Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice*. Respir Physiol Neurobiol 139(2):191-202, 2004

Weissmann N, F Grimminger, W Seeger. *Hypoxia in lung vascular biology and disease*. Cardiovasc Res 71(4):618-619, 2006

Weissmann N, B Gerigk, O Kocer, M Nollen, S Hackemack, HA Ghofrani, RT Schermuly, G Butrous, A Schulz, M Roth, W Seeger, F Grimminger. *Hypoxia-induced pulmonary hypertension: different impact of iloprost, sildenafil, and nitric oxide*. Respir Med 101(10):2125-32, 2007

Weissmann N, S Hackemack, BK Dahal, SS Pullamsetti, R Savai, M Mittal, B Fuchs, T Medebach, R Dumitrascu, M Eickels, HA Ghofrani, W Seeger, F Grimminger, RT Schermuly. *The soluble guanylate cyclase activator HMR1766 reverses hypoxia-induced experimental pulmonary hypertension in mice*. Am J Physiol 297:L658-65, 2009

White AA und GD Aurbach. *Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues*. Biochem Biophys Acta 191(3):686-697, 1969

Wilson DW, HJ Segall, CW Pan, SK Dunston. *Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats*. Microvasc Res 38:57-80, 1989

Wingerter O. *Die Rolle der löslichen Guanylatzyklase in der Signaltransduktion durch Superoxidanionradikale*. Dissertation, Frankfurt 2005

Wu CC, FN Ko, SC Kuo, FY Lee, CM Teng. *YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase*. Br J Pharmacol 116:1973-1978, 1995

Wu W, O Platoshyn, AL Firth, JX Yuan. *Hypoxia divergently regulates production of reactive oxygen species in human pulmonary and coronary artery smooth muscle cells*. Am J Physiol 293:L952-L959, 2007

Wunder F, JP Stasch, J Hutter, C Onso-Alija, J Huser, E Lohrmann. *A cell-based cGMP assay useful for a ultra-high-throughput screening an identification of modulators of the nitric oxide/cGMP pathway*. Anal Biochem 339:104-112, 2005

Yuan JX-J, JGN Garcia, CA Hales, S Rich, SL Archer, JB West, editors. Textbook of pulmonary vascular disease. New York: Springer US.184:453–458, 2011

Zabel U, C Kleinschnitz, P Oh, P Nedvetsky, A Smolenski, H Muller, P Kronich, P Kugler, JE Schnitzer, HHHW Schmidt. *Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide*. Nat Cell Biol 4(4):307-311, 2002

Zhao Y und M Marletta. *Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase*. Biochemistry 36:15959–15964, 1997

Zhao Y, PE Brandish, DP Ballou, MA Marletta. *Molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci USA 96:14753-12758, 1999

Zhou Z, S Gross, C Roussos, S Meurer, W Muller-Esterl, A Papapetropoulos. *Structural and functional characterization of the dimerization region of soluble guanylyl cyclase*. J Biol Chem 279:24935–24943, 2004

Zhou Z, A Pyriochou, A Kotanidou, G Dalkas, M van Eickels, G Spyroulias, C Roussos, A Papapetropoulos. *Soluble guanylyl cyclase activation by HMR-1766 (ataciguat) in cells exposed to oxidative stress*. Am J Physiol 295:H1763-H1771, 2008



## 9 Publikationen

Weissmann N, **S Hackemack**, BK Dahal, SS Pullamsetti, R Savai, M Mittal, B Fuchs, T Medebach, R Dumitrascu, M Eickels, HA Ghofrani, W Seeger, F Grimminger, RT Schermuly. *The soluble guanylate cyclase activator HMR1766 reverses hypoxia-induced experimental pulmonary hypertension in mice.* Am J Physiol 297:L658-65, 2009

Schermuly RT, JP Stasch, SS Pullamsetti, R Middendorff, D Müller, KD Schlüter, A Dingendorf, **S Hackemack**, E Kolosionek, C Kaulen, R Dumitrascu, N Weissmann, J Mittendorf, W Klepetko, W Seeger, HA Ghofrani, F Grimminger. *Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension.* Eur Respir J 32(4):881-91, 2008

Weissmann N, B Gerigk, O Kocer, M Nollen, **S Hackemack**, HA Ghofrani, RT Schermuly, G Butrous, A Schulz, M Roth, W Seeger, F Grimminger. *Hypoxia-induced pulmonary hypertension: different impact of iloprost, sildenafil, and nitric oxide.* Respir Med 101(10):2125-32, 2007

## 10 Danksagung

Herrn Professor Dr. W. Seeger danke ich für die Möglichkeit im Lungenzentrum der Universität Gießen (Universities of Gießen & Marburg Lung Center, UGMLC) zu arbeiten.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Professor Dr. Weißmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung der umfangreichen Laboreinrichtung und der technischen Ausstattung sowie für die Überlassung des spannenden Themas. Vielen Dank für die stetig kompetente, engagierte Betreuung und für das freundschaftliche Arbeitsverhältnis!

Herrn Professor Dr. E. Burkhardt danke ich ganz besonders für seine herzliche Unterstützung und Vertretung der Dissertation auf veterinärmedizinischer Seite. Weiterhin danke ich ihm für seine Geduld und die stets aufbauenden Worte.

An gleicher Stelle bedanke ich mich bei Professor Dr. Ralph Schermuly für die unkomplizierte Zusammenarbeit und für die ausgezeichnete fachliche und engagierte Betreuung.

Viele Mitarbeiter und Doktoranden des Labor Seegers haben mich während meiner Arbeit im Labor Seeger begleitet. Ganz besonders danke ich Karin Quanz, Anke Voigt, Ewa Bieniek, Dr. Markus Roth, Andreas Hecker, Dr. Rio Dumitrascu, Dr. Bakytbek Egemnazarow, Dr. Bhola Kumar Dahal, Ingrid Breitenborn-Müller für die gute Zusammenarbeit im Labor Seeger. Mein weiterer großer Dank gilt Dr. Hans Eisele und Nisha Balsara, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Familie Mac Donald danke ich herzlich für das Korrekturlesen der englischsprachigen Zusammenfassung, somit konnte ich der grammatikalischen Richtigkeit dieses Abschnittes sicher sein.

Einen ganz besonderen lieben Dank gilt meinen besten Freundinnen Kathrin Wiederhold und Frauke Ostermann, die immer eine helfende Hand hatten und somit zum Gelingen

dieser Arbeit beigetragen haben. Mit Eurer Hilfe habt Ihr mir immer wieder neuen Antrieb gegeben. Vielen Dank für alles!

Meiner Familie, besonders meinen Eltern Erika und Dr. Axel Hackemack, danke ich herzlich für Ihre Unterstützung und dass sie mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht haben. Meiner Tante Christiane Schulz-Habiuk, meinem Onkel Bernd Habiuk und meiner verstorbenen Oma Hanna Schulz danke ich herzlich für die lange und schöne Zeit während meines Studiums und meiner Dissertation in Gießen. Meine Schwiegereltern Maria und Heinrich Döbert, meinem Gesohn Felix Stütz mit seiner Frau Chantal Wilhelm-Stütz und ihrer gemeinsamen Tochter, meiner Enkelin Emilia Stütz haben mich während der Zeit meiner Dissertation begleitet und mir immer neuen Mut gegeben. Meinem Vater Dr. Axel Hackemack und meinem Schwiegervater Heinrich Döbert danke ich sehr für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ihr alle habt immer an meiner Seite gestanden und mir viel Kraft gegeben, vielen Dank für Eure moralische Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit!

Auch all meinen anderen Verwandten und besten Freunden möchte ich ein großes Dankeschön sagen. Ohne Euch wäre das Leben viel zu langweilig. Ihr seid die Besten!

Am meisten danke ich meiner Frau Daniela Döbert von ganzem Herzen. Danke für Deinen Antrieb, für Deine Zuversicht und Deine Liebe, Du bist mein Ein und Alles.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6676-5



9 78 3 8359 6676 5